

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. Petra Baráčková

**Vliv inhibitorů tyrosinkinas vandetanibu a lenvatinibu a cytotoxického
alkaloidu ellipticinu na biotransformační enzymy**

The effect of tyrosinkinase inhibitors vandetanib and lenvatinib and cytotoxic alkaloid
ellipticine on biotransformation enzymes

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Helena Dračínská, Ph.D.

Praha, 2019

PROHLÁŠENÍ:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Heleny Dračínské, Ph.D. a veškeré použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne

.....

Bc. Petra Baráčková

PODĚKOVÁNÍ:

Ráda bych tímto poděkovala **RNDr. Heleně Dračínské, Ph.D.** za odborné vedení mé diplomové práce, za teoretické i praktické seznámení s používanými metodami a za trpělivost a ochotu, které mi v průběhu zpracovávání věnovala. Dále bych ráda poděkovala Matúši Kolárikovi za spolupráci a cenné rady a všem kolegům z laboratoří 219 a 221 za vytvoření příjemného pracovního prostředí. V neposlední řadě děkuji paní laborantce Anně Ammerové za podporu a veškerou péči, kterou mi během zpracovávání poskytovala.

Práce byla podporována grantem (GAČR): „*Komplexní pohled na mechanismus působení a metabolismus inhibitorů tyrosinkinas a studium přístupů k potenciaci jejich protinádorové účinnosti*“ (GAČR:18-10251S).

ABSTRAKT

Inhibitory tyrosinkinas jsou v posledních letech hojně využívanou skupinou látek pro cílenou terapii mnoha typů rakoviny. Doposud byl zkoumán především jejich metabolismus, na druhou stranu o jejich vlivu na expresi a aktivitu biotransformačních enzymů je známo jen velmi málo. Přitom právě změna exprese a aktivity enzymů může mít za následek nežádoucí interakce současně podávaných léčiv a jejich neblahé účinky na organismus.

Tato diplomová práce studuje působení inhibitorů tyrosinkinas vandetanibu a lenvatinibu a cytotoxického alkaloidu ellipticinu na vybrané biotransformační enzymy v modelovém organismu laboratorního potkana *in vivo*. Cílem bylo charakterizovat vliv zkoumaných látek na genovou expresi, proteinovou expresi a aktivitu cytochromů P450 (CYP) 1A1, 1A2 a 1B1 a flavinových monooxygenas FMO1 a FMO3 v ledvinách a játrech.

Z ledvin potkanů kontrolních a premedikovaných zkoumanými látkami byly izolovány mikrosomy a RNA. Pomocí elektropřenosu metodou Western blot a následné imunodetekce byla sledována a porovnána míra proteinové exprese CYP1A1/2 v ledvinách a CYP1B1, FMO1 a FMO3 v ledvinách a v játrech. Reverzní transkripce byla z izolované RNA připravena cDNA, která byla využita jako templát pro kvantitativní PCR, pomocí které byla porovnána relativní míra genové exprese CYP1A1/2 v ledvinách a CYP1B1, FMO1 a FMO3 v ledvinách a v játrech. Za použití specifických enzymových reakcí byl také zkoumán vliv studovaných látek na aktivitu CYP1A1/2 v ledvinách a aktivitu FMO v ledvinách a játrech experimentálních zvířat.

Byl potvrzen výrazný indukční potenciál ellipticinu na expresi a aktivitu CYP1A1/1A2 v ledvinách. Výsledky naznačily, že vandetanib a lenvatinib jsou potenciálními induktory CYP1A1 na úrovni proteinové exprese, genové exprese i enzymové aktivity a zároveň že inhibitory tyrosinkinas zvyšují indukční potenciál ellipticinu na CYP1A1/1A2. Dále bylo zjištěno, že FMO nebyly významně ovlivněny zkoumanými látkami na úrovni proteinové či genové exprese.

Indukční vliv vandetanibu a lenvatinibu na expresi CYP1A1 by mohl mít za následek změny v metabolismu a tedy i účinnosti léčiva, které by bylo podáváno současně s těmito látkami a bylo tímto enzymem přeměňováno, a vyvolat tak nežádoucí účinky na organismus.

Klíčová slova: biotransformace, cytochromy P450, ellipticin, flavinové monooxygenasy, inhibitory tyrosinkinas, lenvatinib, vandetanib

ABSTRACT

In recent years, tyrosine kinase inhibitors have been widely used for the treatment of certain tumors as so-called targeted therapy. Many studies are concerned with their metabolism and the role of enzymes in the biotransformation process, but very little is known about the impact of tyrosine kinase inhibitors on the expression and activity of biotransformation enzymes. Nevertheless modification of the expression and activity of enzymes may cause adverse interactions of co-administered drugs and their negative impact on the human body.

This diploma thesis studies the effect of tyrosine kinase inhibitors vandetanib and lenvatinib and cytotoxic alkaloid ellipticine on biotransformation enzymes in a rat model organism *in vivo*. The aim was to characterize the effect of the investigated compounds on gene expression, protein expression and activity of cytochromes P450 (CYP) 1A1, 1A2 and 1B1 and flavin-containing monooxygenases FMO1 and FMO3 in renal and hepatic microsomes.

Microsomes and RNA were isolated from kidneys of control rats and the pretreated rats. Western blot and immunodetection was used to compare the protein expression levels of studied enzymes in kidney and liver. By reverse transcription, cDNA was prepared from isolated RNA and used as a template for quantitative PCR to compare the relative gene expression in kidney. The effect of investigated substances on CYP1A activity in the microsomal fractions was measured as 7-ethoxyresorufin *O*-deethylation. FMO activity was measured as methyl *p*-tolyl sulfide oxidation.

It has been confirmed that ellipticine is potent inducer of CYP1A1/1A2 in kidney as well as CYP1B1 in both liver and kidney. The results indicate that vandetanib and lenvatinib induce CYP1A1 at the level of protein expression, gene expression and activity. Furthermore, they potentially increase the inducing impact of ellipticine on CYP1A1/1A2. FMOs were not significantly affected by the investigated substances at the protein or gene expression level.

The inducing effect of vandetanib and lenvatinib on the expression of CYP1A1 could result in a modulation of metabolism and changes in the efficacy of the co-administred drugs, which undergo biotransformation by this enzyme, and cause adverse effects on the organism.

(In Czech)

Keywords: biotransformation, cytochromes P450, ellipticine, flavin-containing monooxygenases, lenvatinib, vandetanib, tyrosinkinase inhibitors

OBSAH

| | |
|---|----|
| Seznam zkratk | 8 |
| 1 LITERÁRNÍ ÚVOD | 10 |
| 1.1 Biotransformace | 11 |
| 1.2 Biotransformační enzymy | 12 |
| 1.2.1 Cytochromy P450 | 12 |
| 1.2.1.1 Reakční cyklus cytochromů P450 | 13 |
| 1.2.1.2 Nomenklatura cytochromů P450 | 15 |
| 1.2.1.3 Inducibilita cytochromů P450 | 15 |
| 1.2.1.4 Role cytochromů P450 v klinické farmakologii | 16 |
| 1.2.1.5 Cytochromy P450 podrodiny 1A: CYP1A a CYP1A2 | 16 |
| 1.2.1.6 Cytochrom P450 1B1 | 17 |
| 1.2.2 Flavinové monooxygenasy | 18 |
| 1.3 Inhibitory tyrosinkinas jako protinádorová léčiva | 20 |
| 1.3.1 Proteinové tyrosinkinasy | 20 |
| 1.3.2 Inhibitory tyrosinkinas | 22 |
| 1.3.2.1 Vandetanib | 23 |
| 1.3.2.2 Lenvantinib | 24 |
| 1.4 Ellipticin | 26 |
| 1.4.1 Mechanismus působení ellipticinu | 27 |
| 1.4.2 Metabolismus ellipticinu | 28 |
| 2 CÍL PRÁCE | 30 |
| 3 MATERIÁL | 31 |
| 3.1 Přístroje a pomůcky | 31 |
| 3.2 Materiál a chemikálie | 33 |
| 4 METODY | 35 |
| 4.1 Premedikace experimentálních zvířat | 35 |
| 4.2 Izolace mikrosomů | 36 |
| 4.3 Stanovení množství proteinů | 37 |
| 4.4 Stanovení množství cytochromu P450 | 37 |
| 4.5 SDS-PAGE elektroforéza | 38 |

| | | |
|------|---|----|
| 4.6 | Přenos proteinů metodou Western blot a imunodetekce..... | 39 |
| 4.7 | Stanovení aktivity CYP1A1 – <i>O</i> -deethylace 7-ethoxyresorufinu..... | 42 |
| 4.8 | Stanovení aktivity CYP1A2 – <i>O</i> -demethylace 7- methoxyresorufinu..... | 43 |
| 4.9 | Stanovení aktivity FMO – oxidace methyl-p-tolyl sulfidu | 43 |
| 4.10 | Izolace RNA..... | 44 |
| 4.11 | RNA agarosová elektroforéza | 45 |
| 4.12 | Stanovení koncentrace a čistoty RNA..... | 46 |
| 4.13 | Reverzní transkripce – syntéza cDNA | 47 |
| 4.14 | Kvantitativní PCR | 48 |
| 5 | VÝSLEDKY | 49 |
| 5.1 | Charakterizace izolovaných mikrosomů..... | 49 |
| 5.2 | Charakterizace izolované RNA..... | 50 |
| 5.3 | Vliv vandetanibu, lenvatinibu a ellipticinu na expresi a aktivitu cytochromů P450 podrodiny 1A v ledvinných mikrosomech..... | 52 |
| 5.4 | Vliv vandetanibu, lenvatinibu a ellipticinu na expresi cytochromu P450 1B1 v ledvinných a jaterních mikrosomech | 58 |
| 5.5 | Vliv vandetanibu, lenvatinibu a ellipticinu na expresi a aktivitu flavinových monooxygenas v ledvinných a jaterních mikrosomech | 61 |
| 6 | DISKUZE | 68 |
| 7 | ZÁVĚR | 73 |
| 8 | SEZNAM LITERATURY | 74 |

SEZNAM ZKRATEK

| | |
|---------------|--|
| AhR | receptor pro aromatické uhlovodíky (z angl. aryl hydrocarbon receptor) |
| AIF | faktor indukující apoptózu (z angl. apoptosis-inducing factor) |
| ALP | alkalická fosfatasa |
| APS | persíran amonný (z angl. ammonium persulfate) |
| ATP | adenosintrifosfát |
| BAP | benzo[<i>a</i>]pyren |
| BCA | bicinchoninová kyselina (z angl. bicinchonin acid) |
| BCIP | 5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát |
| BCR-ABL | "Breakpoint cluster region protein – Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1" |
| BSA | bovinní sérový albumin |
| CAR | konstitutivní androstanový receptor (z angl. constitutive androstan receptor) |
| cDNA | komplementární deoxyribonukleová kyselina |
| CYP | cytochrom P450 |
| DP | dipeptidasa |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina |
| DMSO | dimethylsulfoxid |
| DTT | dithiotreitol |
| EGFR | receptor pro epidermální růstový faktor (z angl. epidermal growth factor receptor) |
| EROD | <i>O</i> -deethylace 7-ethoxyresorufinu |
| FAD | flavinadenindinukleotid |
| FDA | Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (z angl. Food and drug administration) |
| FGF | fibroblastový růstový faktor (z angl. fibroblast growth factor) |
| FMO | flavinové monooxygenasy |
| GAPDH | glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa |
| GSH | glutathion |
| GST | glutathion-S-transferasa |
| γ -GTP | γ -glutamyltranspeptidasa |
| HPLC | vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. high pressure liquid chromatography) |

| | |
|----------|--|
| Hsp90 | "heat-shock protein 90" |
| MFO | monooxygenasy se smíšenou funkcí (z angl. mixed function oxidases) |
| mRNA | mediátorová ribonukleová kyselina |
| MROD | <i>O</i> -demethylace 7-methoxyresorufinu |
| MTC | medulární karcinom štítné žlázy (z angl. medullary thyroid cancer) |
| MTS | methyl p-tolyl sulfid |
| NADPH | nikotinamidadenin dinukleotid fosfát |
| NBT | nitrobluetetrazolium |
| NRTK | nereceptorové tyrosinkinasy |
| PDGFR | receptor pro růstový faktor odvozený od krevních destiček (z angl. platelet-derived growth factor receptor) |
| PMSF | fenylmetansulfonyl fluorid (z angl. phenylmethanesulfonyl fluoride) |
| PTK | proteinové tyrosinkinasy |
| PVDF | polyvinylidenfluorid |
| PXR | pregnanový X receptor (z angl. pregnan X receptor) |
| qPCR | kvantitativní polymerázová řetězová reakce (z angl. quantitative polymerase chain reaction) |
| RET | receptor pro neurotrofický faktor odvozený od gliálních buněk (z angl. glial cell-line derived neurotrophic factor receptor) |
| RNA | ribonukleová kyselina |
| rRNA | ribosomální nukleová kyselina |
| RT | reverzní transkripce |
| RTK | receptorové tyrosinkinasy |
| SDS | dodecylsulfát sodný |
| SDS-PAGE | elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného |
| TCDD | tetrachlorodibenzo-p-dioxin |
| TEMED | tetramethylendiamin |
| TKI | inhibitory tyrosinkinas |
| Tris | tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| VEGFR | receptor pro vaskulární endoteliální růstový faktor (z angl. vascular endothelial growth factor receptor) |

1 LITERÁRNÍ ÚVOD

Cytotoxické látky neboli cytostatika jsou v dnešní době hojně využívány k léčbě mnoha typů rakoviny. Ačkoliv vývoj léčiv tohoto typu v posledních letech velice pokročil, jejich účinnost stále není dostačující a jejich používání je doprovázeno mnoha vedlejšími účinky. To vyvolává poptávku po vývoji nových účinných strategií se specifickým zaměřením na nádorové buňky a s minimálními vedlejšími účinky. Velkou pozornost získaly inhibitory tyrosinkinas, malé organické molekuly blokující životně důležité signální dráhy, které jsou nezbytné pro přežití buněk. V posledních letech došlo k významnému pokroku ve vývoji specifických inhibitorů tyrosinkinas pro cílenou terapii rakoviny [1] a v současné době je Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA, z angl. Food and drug administration) schváleno 47 tyrosinkinasových inhibitorů [2].

Inhibitory tyrosinkinas jsou stejně jako ostatní cizorodé látky (tzv. xenobiotika) metabolizovány v organismu procesem zvaným biotransformace. Působením mnoha biotransformačních enzymů jsou xenobiotika biotransformována za vzniku polárnějších produktů, které mohou být následně z organismu vyloučeny a nedochází tak k jejich bioakumulaci. Vedle detoxikace těchto sloučenin však může biotransformace vést ke vzniku biologicky aktivnějších metabolitů, jejichž vliv na organismus může být jak pozitivní (např. aktivní formy některých léčiv), tak negativní (toxická, mutagenita či karcinogenita metabolitu). Studium metabolismu xenobiotik je tedy velmi důležité, neboť znalost biotransformačních drah konkrétních látek potenciálně umožňuje modulovat jejich účinky na organismus [3].

Značný počet studií se zabývá metabolismem inhibitorů tyrosinkinas a rolí konkrétních biotransformačních enzymů v tomto procesu. Na druhou stranu, o vlivu inhibitorů tyrosinkinas na expresi těchto enzymů je známo jen velmi málo. Tato diplomová práce studuje působení inhibitorů tyrosinkinas vandetanibu a lenvatinibu a cytotoxického alkaloidu ellipticinu na genovou expresi, proteinovou expresi a aktivitu vybraných potkaních biotransformačních enzymů v rámci grantem podpořeného projektu „*Komplexní pohled na mechanismus působení a metabolismus inhibitorů tyrosinkinas a studium přístupů k potenciaci jejich protinádorové účinnosti*“ (GAČR:18-10251S).

1.1 Biotransformace

Veškeré organismy jsou neustále vystavovány působení cizorodých látek (xenobiotik), ať už se jedná o látky přírodního původu, například metabolity a toxiny produkované plísněmi, rostlinami a zvířaty, nebo látky vyrobené uměle, jako jsou průmyslové chemikálie a látky znečišťující prostředí, aditivní látky v potravinách nebo také veškerá léčiva. Fyzikální vlastností, která umožňuje vstup xenobiotik do organismu, ať už pokožkou, dýchacími cestami nebo gastrointestinálním traktem, je jejich rozpustnost v tucích (lipofilita). Ta je zároveň největší překážkou jejich vyloučení, neboť lipofilní sloučeniny jsou v organismu snadno reabsorbovány. Principem eliminace xenobiotik je tedy přeměna jejich vlastností z lipofilních na hydrofilní v procesu zvaném biotransformace. Díky přeměně na polárnější sloučeniny se xenobiotika stanou rozpustnými ve vodě (hydrofilními) a mohou být vyloučena z organismu močí nebo výkaly [4].

V některých případech může mít biotransformace xenobiotika vliv aktivační místo detoxikační, což znamená, že vzniklý derivát je biologicky více aktivní než samotné xenobiotikum. V závislosti na konkrétních sloučeninách lze tento vliv považovat za pozitivní, například při přeměně nějakého léčiva na jeho aktivnější formu. Stejně tak se však mohou do organismu dostat látky, jejichž přeměnou vznikají metabolity toxické, mutagenní či karcinogenní [3,5].

Metabolická modifikace xenobiotik v procesu biotransformace probíhá zpravidla ve dvou hlavních krocích, ve kterých postupně dochází ke zvyšování polaritý cizorodé látky. V I. fázi biotransformace (tzv. derivatizační) jsou do lipofilní sloučeniny prostřednictvím oxidace, redukce nebo hydrolýzy buď zavedeny funkční skupiny ($-OH$, $-NH_2$, $-SH$ a $-COOH$), nebo jsou již přítomné polární funkční skupiny demaskovány. Klíčovými enzymy, katalyzujícími reakce I. fáze biotransformace, jsou cytochromy P450 a flavinové monooxygenasy, dále dioxygenasy, alkoholdehydrogenasa, aldehyddehydrogenasa a katalasa. Následuje fáze II, která se nazývá konjugace, neboť dochází ke konjugaci metabolitů I. fáze s endogenními látkami, jako jsou kyselina glukuronová (glukuronidace), některé aminokyseliny (cystein, glycin, taurin, glutamát), aktivní sulfát (sulfonace), glutathion atd. Těmito reakcemi dochází k výraznému zvýšení hydrofility xenobiotik, díky čemuž mohou být vyloučena z organismu [4,6].

1.2 Biotransformační enzymy

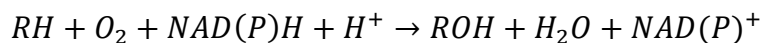
Enzymy katalyzující biotransformaci xenobiotik jsou široce distribuovány v celém těle a vyskytují se v různých buněčných kompartmentech. U obratlovců jsou nejbohatším zdrojem biotransformačních enzymů játra, dále se vyskytují v kůži, plicích, nosní sliznici a sliznici gastrointestinálního traktu, tedy v místech hlavní expozice xenobiotik [4]. Dalšími orgány, ve kterých je hojné zastoupení těchto enzymů, jsou ledviny, slinivka břišní, slezina, srdce, mozek, varlata, vaječníky a další [7].

Tato práce se zaměřuje na enzymy nejvíce participující na oxidativních reakcích, a to konkrétně cytochromy P450 a flavinové monooxygenasy, proto budou blíže popsány v následujících kapitolách.

1.2.1 Cytochromy P450

Cytochromy P450 (CYP) jsou hemové enzymy, které vykazují široký oxidační potenciál s nejrůznějšími typy substrátů. Primárně jsou lokalizovány v hladkém endoplasmatickém retikulu, mohou se však vyskytovat i v dalších organelách, jako například v mitochondriích [5]. CYP jsou terminální oxidasou multisložkového systému monooxygenas se smíšenou funkcí (MFO, z angl. mixed function oxidases) [8]. Tato skupina enzymů byla pojmenována podle svého charakteru a svých neobvyklých, zato typických spektrálních vlastností – cytochrom vyjadřuje, že se jedná o hemoprotein, P je zkratka pro pigment a 450 odráží typické absorpční maximum redukováného komplexu enzymu s CO při 450 nm, čehož se dodnes využívá k určení obsahu CYP [9]. Posun absorpčního maxima cytochromů P450 k červenému konci spektra je oproti jiným hemoproteinům, u kterých se absorpční pásmo pohybuje v rozmezí 380-420 nm [8], indukován přítomností thiolátové skupiny cysteinu, která je ligandem hemového železa. Vhodnější označení této skupiny enzymů by tedy bylo spíše "hemthiolátové proteiny P450" [10].

Dalším důvodem, proč nejsou CYP typickými cytochromy, je ten, že se nejedná o proteiny pouze přenášející elektrony, nýbrž o terminální monooxygenasy přenášející molekulární kyslík na X-H vazby, kde X představuje uhlík, dusík či síru [11]. CYP tedy aktivují molekulární kyslík, přičemž jeden atom včleňují do substrátu a druhý současně využívají k tvorbě molekuly vody. Obecnou sumární rovnici průběhu monooxygenasové reakce katalyzované za přítomnosti CYP lze vyjádřit následovně [8]:

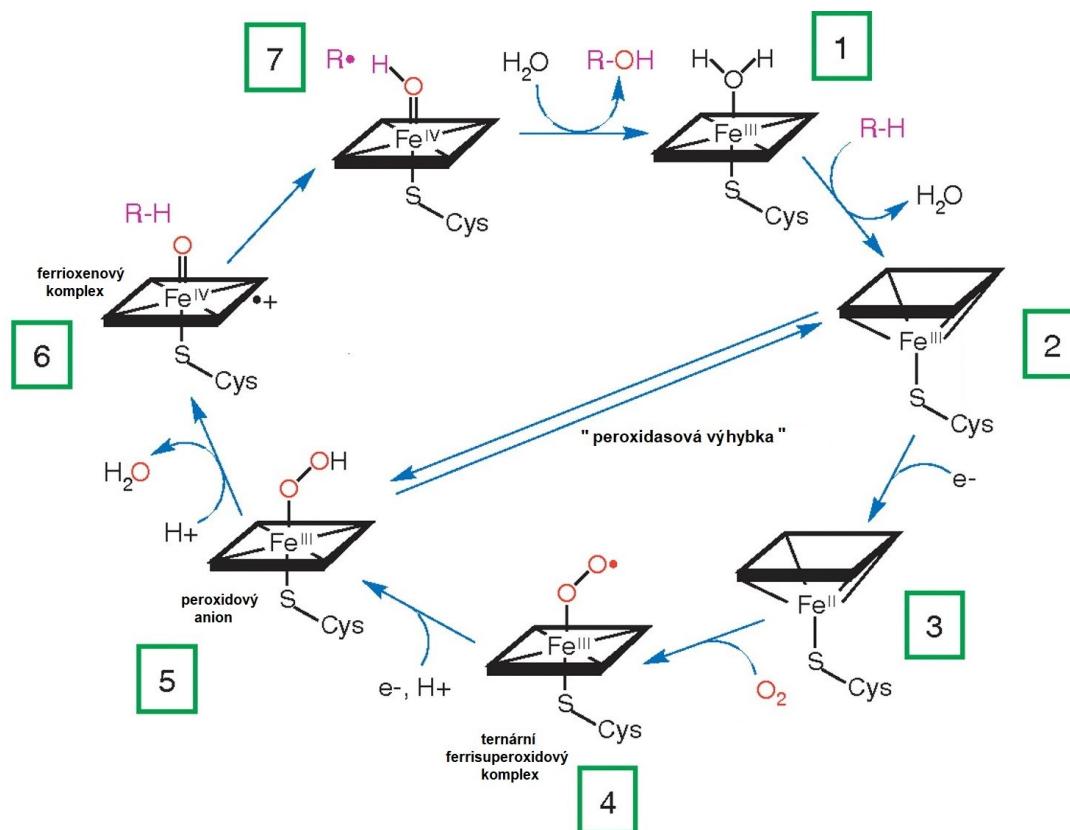


Reakce katalyzované cytochromy P450 jsou velmi rozdílné. Bylo popsáno více než 20 různých typů reakcí, z nichž nejčastější je hydroxylace, dále N-, O- a S-dealkylace, sulfoxidace, epoxidace, deaminace, desulfurace, dehalogenace, peroxidace a další [12]. Katalýza za přítomnosti cytochromů P450 tedy pokrývá velice širokou škálu reakcí, které v organismu přispívají k životně důležitým procesům, jako je asimilace zdroje uhlíku, biosyntéza steroidních hormonů a strukturních složek buněk či degradace xenobiotik, a také procesům škodlivým, jako například karcinogeneze [13]. CYP participující na biotransformaci xenobiotik mají zpravidla širokou substrátovou specifitu – hydroxylují celou škálu organických sloučenin, například polutantů, jako jsou aromatické či alifatické uhlovodíky, polycyklické aromatické nitrosloučeniny, aromatické i alifatické aminy či fenoly, a dále pak řadu farmaceutik [14].

1.2.1.1 Reakční cyklus cytochromů P450

Schéma reakčního cyklu cytochromů P450 je zobrazeno na obrázku 1 (strana 14). Jedná se o velmi uspořádaný vícestupňový mechanismus. V klidovém stavu (1) je železo v hemové struktuře enzymu hexakoordinované, tedy v nízkospinovém stavu, a v oxidačním čísle III (tzv. ferri forma). Na trojmocné železo je navázána molekula vody nebo interní (aminokyselinový) ligand. Po vstupu substrátu (R-H) do aktivního místa dochází k vytlačení tohoto šestého ligandu a železo přechází do vysokospinové formy (2) za současné konformační změny v molekule enzymu, která se projeví změnou spektrálních vlastností enzymu. Následně dochází k interakci cytochromu P450 s elektronem katalyzované NADPH:CYP reduktasou, čímž se železo redukuje na Fe^{II} (tzv. ferro forma), přičemž zůstává pentakoordinované a je tedy schopné vázat molekulární kyslík či jiné ligandy (3). Navázáním molekulárního kyslíku přechází železo opět do trojmocné hexakoordinované (nízkospinové) formy a tvoří se tzv. ternární ferrisuperoxidový komplex (4). Tento komplex však není příliš stabilní a snadno podléhá jedoelektronové redukci katalyzované NADPH:CYP reduktasou nebo NADPH:cytochrom b_5 reduktasou za vzniku peroxidového aniontu (5), který představuje plně aktivovanou formu cytochromu P450. Následně dochází ke štěpení vazby O-O, přičemž jeden atom kyslíku je redukován za vzniku vody, zatímco druhý zůstává vázán na hemovém železu a vzniká tzv. ferrioxenový komplex (6). Poté dochází k vytržení vodíkového atomu z molekuly substrátu za vzniku radikálu substrátu (7). Následnou reakcí s vodou dochází k uvolnění hydroxyderivátu substrátu (R-OH) a regeneraci nativní molekuly cytochromu P450 [14].

V přítomnosti oxidačních činidel může z pentakoordinované trojmocné formy vznikat přímo peroxidový anion. Tato reakce bývá označována jako peroxidasová aktivita cytochromu P450 [14] či "peroxidasová výhybka" [15].



Obrázek 1: Reakční cyklus cytochromu P450. V klidovém stavu (1) je železo v hemové struktuře enzymu hexakoordinované a v oxidačním čísle III. Po vstupu substrátu dochází k vytlačení šestého ligandu a železo přechází do pentakoordinovaného stavu (2). Následná interakce CYP s elektronem způsobí redukci železa na Fe^{II} (3). Navázáním molekulárního kyslíku přechází železo opět do trojmocné hexakoordinované formy a tvoří se tzv. ternární ferrisuperoxidový komplex (4), který není stabilní a podléhá redukci za vzniku peroxidového aniontu (5). Následně dochází ke štěpení vazby O-O za vzniku tzv. ferrioxenového komplexu (6) a vody. Vytržením atomu vodíku z molekuly substrátu vzniká radikál (7). Reakcí s vodou se uvolní hydroxyderivát substrátu a molekula CYP se regeneruje do nativní formy. Převzato a upraveno z [15].

1.2.1.2 Nomenklatura cytochromů P450

Cytochromy P450 jsou vzhledem k velkému množství zástupců rozdělovány na základě sekvenční homologie do genetických rodin a podrodin. Po kořenovém symbolu CYP následuje číslo označující rodinu, což je skupina proteinů s více než 40% identitou aminokyselinové sekvence, která sestává z více než 200 aminokyselin. Dále se udává písmeno označující podrodinu, ve které mají zástupci identitu aminokyselinové sekvence vyšší než 55 %. Číslo na posledním místě představuje číslo genu [13]. V databázi cytochromů P450 je uváděno, že je známo 267 rodin s více než 5 000 geny kódující CYP [10,16].

1.2.1.3 Inducibilita cytochromů P450

Množství cytochromů P450 v jednotlivých tkáních nelze považovat za absolutní. Jejich koncentrace je závislá na mnoha faktorech, jako jsou genetický polymorfismus, věk, pohlaví, vliv vnějšího prostředí (chemické polutanty apod.), stravovací návyky, konzumace alkoholu, kouření nebo působení podávaných léčiv. Zásadní roli hraje vlastnost některých CYP zvaná inducibilita. Hladinu inducibilních enzymů ve tkáních je možné extrémně zvýšit působením konkrétních induktorů, i když jsou přítomny v mizivém množství [3]. Příklady takových induktorů jsou tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) a cigaretový kouř pro CYP1A1 a 1A2, barbituráty pro CYP2B, ethanol pro CYP2E1 nebo rifampicin pro mnoho izoform, ale především pro CYP3A4 [17]. Množství těchto enzymů může vzrůst až 100x. Enzymy, které udržují svoji koncentraci v organismu konstantní nezávisle na přítomnosti induktoru, označujeme jako konstitutivní [3] a příkladem takového enzymu je CYP2D6 [17].

Indukce exprese je převážně způsobena aktivací transkripce, což má za následek zvýšení produkce mRNA v buňkách a následné syntézy proteinu. K indukci exprese může dojít také na translační úrovni stabilizací mRNA nebo posttranslační úrovni stabilizací proteinu, jako je tomu v případě CYP2E1 [18,19]. Transkripční aktivace je zprostředkována především jadernými receptory PXR (pregnanový X receptor, z angl. pregnan X receptor) a CAR (konstitutivní androstanový receptor, z angl. constitutive androstan receptor) pro indukci izoform CYP3A, CYP2B a CYP2C a pomocí cytosolárního receptoru AhR (z angl. aryl hydrocarbon receptor) pro indukci izoform CYP1A. Zda je indukce exprese enzymů pro organismus prospěšná nebo škodlivá závisí na konkrétním xenobiotiku, kterému je organismus vystaven. Například indukce izoform CYP1A vede u hlodavců ke snížení karcinogenity imunosupresoru 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracenu. Na druhou stranu mohou

však CYP1A aktivovat například benzo[a]pyren (BaP) na jeho karcinogenní metabolit, jejich indukce tedy naopak riziko karcinogenity BaP zvyšuje [18].

1.2.1.4 Role cytochromů P450 v klinické farmakologii

Cytochromy P450 představují hlavní skupinu enzymů, která je schopna biotransformovat většinu léčiv a jiných lipofilních xenobiotik. Podílejí se až na 75 % veškerého metabolismu léků a mají proto zvláštní význam pro klinickou farmakologii. Z těchto biotransformačních reakcí se 95 % účastní 5 z 57 lidských CYP. Konkrétně se jedná o izoformy 1A2, 2C9, 2C19, 2D6 a v největší míře 3A4/5, dále jsou zapojeny izoformy 1A1, 2B6 a 2E1 [20,21]. Znalost reakčního mechanismu cytochromů P450 a správná predikce metabolismu xenobiotika jsou jedny z klíčových faktorů při vývoji nových účinných léčiv.

Velkým problémem při podávání léčiv jsou jejich vedlejší účinky, které jsou velmi často vyvolány vzájemným působením více léků. Nežádoucí interakce léčiv a jejich neblahé účinky na organismus mohou být způsobeny změnou aktivity biotransformačních enzymů [22]. Některá léčiva totiž mohou inhibovat působení cytochromů P450, které tak nejsou schopné plnit svou biotransformační funkci, což může vést k akumulaci paralelně podávaného léčiva v organismu, zvláště po opakovaných dávkách. Stejný případ může nastat, pokud má jedinec inherentní (např. genetický) nedostatek určitého CYP [20]. Naopak existují také látky, které expresi cytochromů P450 indukují, což může vést k urychlení metabolismu a snížení účinnosti společně podávaného léčiva [22]. Znalost faktorů a látek, které ovlivňují expresi a aktivitu odpovědných biotransformačních enzymů, je tedy jedním z hlavních předpokladů pro účinné působení léčiva [17].

Cytochromy P450 1A1 a 1A2 a dále také 2E1 a 3A4 se vedle metabolismu léčiv významně podílejí na přeměně prokarcinogenů na jejich aktivní formy a jsou proto zkoumány v souvislosti s procesem kancerogeneze. Zároveň jsou však izoformy CYP1A1, 1A2 a 3A4 velmi důležitými účastníky při biotransformaci protinádorových léčiv, je proto nutné při jejich studiu brát v úvahu obě tyto skutečnosti [3].

1.2.1.5 Cytochromy P450 podrodiny 1A: CYP1A1 a CYP1A2

Podrodinu 1A cytochromů P450 tvoří dva zástupci, CYP1A1 a CYP1A2. Tyto izoformy jsou si strukturně velmi podobné, vykazují až 70% homologii v aminokyselinové sekvenci [3]. Také jejich substrátová specifita a katalytická aktivita není příliš odlišná, oba enzymy se velmi významně podílejí na oxidační biotransformaci xenobiotik, a to především

polycyklických aromatických uhlovodíků, heterocyklických sloučenin a aromatických aminů či amidů [23].

I přes strukturní a katalytickou podobnost se mezi sebou tyto dva enzymy liší, a to výskytem v organismu. Zatímco u lidí je CYP1A2 konstitutivně exprimován ve vyšších hladinách pouze v játrech, CYP1A1 je primárně extrahepatální enzym [17], vyskytující se v plicích, tenkém a tlustém střevě, ledvinách, kůži a placentě [4,24].

Obě izoformy podrodiny 1A jsou silně inducibilní. K indukci dochází aktivací transkripce pomocí cytosolárního Ah receptoru po navázání příslušných ligandů, kterými mohou být substráty CYP1A [18,23]. Významnými induktory CYP1A1/1A2 jsou polycyklické aromatické uhlovodíky a kouření [3,24]. K silným induktorům CYP1A se řadí také v této práci studovaný ellipticin [25].

Cytochromy podrodiny 1A jsou velice významnými bioaktivátory různých prokarcinogenů na jejich aktivní formy. Jedná se především o polycyklické aromatické uhlovodíky (například benzo[*a*]pyren) a aromatické aminy či amidy, přítomné v potravinách nebo v ovzduší jako důsledek průmyslového spalování [17,26]. Oba enzymy se zároveň podílejí na aktivaci genotoxických sloučenin přítomných v cigaretovém kouři [3,24]. Uvádí se, že enzymy CYP1A mohou aktivovat až 90 % všech dosud známých karcinogenů [3].

1.2.1.6 Cytochrom P450 1B1

CYP1B1 je jediným zástupcem cytochromů podrodiny 1B, s ostatními izoformami rodiny 1 – CYP1A1 a CYP1A2 – vykazuje 40% homologii aminokyselinové sekvence [27]. Jedná se o enzym exprimovaný konstitutivně ve tkáních jako je srdce, mozek, plíce, játra, ledviny, prsa a prostata [28,29]. V porovnání se zdravými tkáněmi byly však mnohem vyšší hladiny CYP1B1 zjištěny v nádorových buňkách [27]. Tento enzym je nadměrně exprimován v různých typech karcinomů, jako například prsu, tlustého střeva, jícnu, kůže, varlat apod., ve zdravých tkáních však nikoliv [29].

Podobně jako obě izoformy 1A je také CYP1B1 inducibilní pomocí Ah receptoru a jeho nejvýznamnějšími induktory jsou opět polycyklické aromatické uhlovodíky, jako například benzo[*a*]pyren nebo 3-methylcholanthren [26]. Společně s CYP1A se také významně podílí na přeměně těchto polycyklických aromatických uhlovodíků na jejich karcinogenní formy [29]. Lidský CYP1B1 katalyzuje přeměnu estrogenů na jejich aktivní 4-hydroxylované deriváty, které mohou způsobit rakovinu prsu [18]. Zároveň však tento

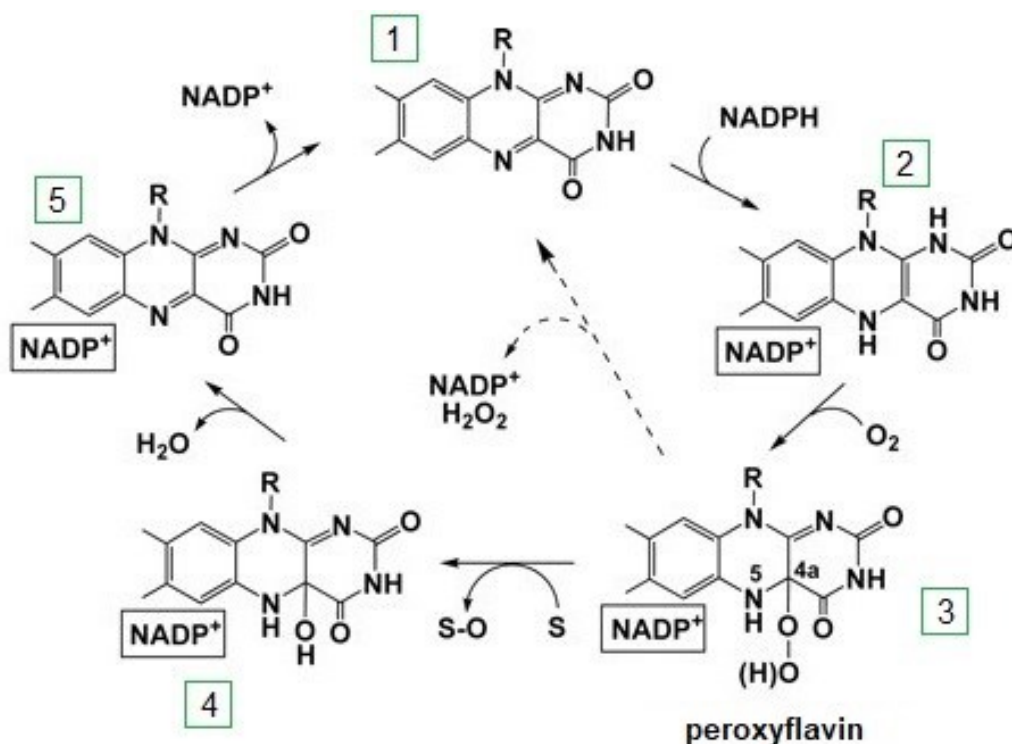
enzym participuje na metabolismu některých klinicky významných protinádorových léčiv [18].

1.2.2 *Flavinové monooxygenasy*

Flavinové monooxygenasy (FMO, z angl. flavin-containing monooxygenase) jsou enzymy podílející se na oxidoredukčních reakcích I. fáze biotransformace xenobiotik ve velmi širokém spektru organismů včetně bakterií, hub, rostlin, bezobratlých živočichů i obratlovců [30]. U savců se vyskytuje 5 typů enzymů rodu FMO, které se označují FMO1 až FMO5. Obsahují přibližně 550 aminokyselinových zbytků a ve svých aminokyselinových sekvencích jsou až z 58 % identické napříč biologickými druhy [4,31]. V rámci studia lidského genomu byl objeven také gen *FMO6*, avšak jeho exprese nebyla prokázána a je tedy považován za pseudogen [32]. V eukaryotických buňkách jsou FMO exprimovány v membránách endoplazmatického retikula, kde katalyzují oxidační metabolismus velmi různorodých a strukturně odlišných látek [30].

Každý enzym rodu FMO obsahuje vysoce konzervovanou glycinovou oblast, která nekovalentně váže FAD v blízkosti aktivního místa, které sousedí s další vysoce konzervovanou oblastí bohatou na glycin, na kterou se váže NADPH [4].

Pomocí katalýzy flavinovými monooxygenasami je oxidováno mnoho typů heteroatomů v cizorodých látkách, především se jedná o dusík, síru a fosfor. Pro svou katalytickou aktivitu tedy FMO potřebují FAD jako prostetickou skupinu, NADPH jako kofaktor a dále molekulární kyslík jako kosubstrát [30]. Schéma reakčního cyklu FMO je zobrazeno na obrázku 2 (strana 19). Na rozdíl od reakčního cyklu CYP nezačíná mechanismus FMO vazbou substrátu. V prvním kroku katalytického cyklu podléhá FAD (1) dvouelektronové redukci pomocí NADPH. Redukovaná forma FADH_2 (2) rychle reaguje s molekulárním kyslíkem za vzniku velice stabilního meziproductu peroxyflavinu (3), který je připravený oxidovat jakýkoliv vhodný substrát, přistupující k aktivnímu místu enzymu. Substrát nukleofilně atakuje peroxyflavin a dochází k přenosu jednoho atomu molekulárního kyslíku na substrát (4), přičemž druhý atom je využit k tvorbě vody (5). Cyklus je dokončen uvolněním oxidovaného NADP^+ a regenerací nativního enzymu. Neobvyklým rysem této skupiny enzymů je, že vazba substrátu nemá žádný vliv na rychlost reakce, na rozdíl od mechanismu CYP. V některých případech byl pozorován únik reaktivních kyslíkových látek (peroxid vodíku) z peroxyflavinu za vzniku neaktivního enzymu a uvolnění NADP^+ [33,34].



Obrázek 2: Reakční cyklus flavinových monooxygenas. V prvním kroku podléhá FAD (1) dvouelektronové redukci pomocí NADPH. Redukovaná forma $FADH_2$ (2) rychle reaguje s molekulárním kyslíkem za vzniku stabilního meziproduktu peroxyflavinu (3). Substrát nukleofilně atakuje peroxyflavin a dochází k přenosu jednoho atomu molekulárního kyslíku na substrát (4), přičemž druhý atom je využit k tvorbě vody (5). Cyklus je dokončen uvolněním oxidovaného $NADP^+$ a regenerací nativního enzymu. V některých případech byl pozorován únik reaktivních kyslíkových látek (peroxid vodíku) z peroxyflavinu za vzniku neaktivního enzymu a uvolnění $NADP^+$. Převzato a upraveno z [35].

FMO oxidují širokou škálu sloučenin obsahujících síru, dusík, fosfor, dále také uhlík či selen a preferují nukleofilní nenabitě substráty či substráty s jedním kladným nábojem. Kromě monooxygenace mohou FMO katalyzovat také oxidační dekarboxylaci, oxidační demethylaci či tvorbu disulfidové vazby [36]. Výsledkem biotransformace pomocí FMO bývají N-oxidy, hydroxylaminy a sulfoxidy, které jsou polární, a tudíž mohou být detoxifikovány. Avšak některé N-hydroxylované produkty primárních a sekundárních aminů metabolizované pomocí FMO mohou způsobit inhibici CYP [30].

Enzymy skupiny flavinových monooxygenas se velmi významně podílí na biotransformaci xenobiotik včetně mnoha léčiv, jako například benzydamín, chlorpromazín, klozapín, amfetamin a metamfetamin a další [4]. Nejvíce typů substrátů je metabolizováno

pomocí FMO1, která je u člověka hlavním ledvinným enzymem. Následuje FMO3, která je naopak exprimována především v játrech, ve kterých FMO1 zcela chybí. Izoforma FMO3 je v játrech doprovázena FMO5. FMO se dále vyskytují v tenkém střevě nebo v plicích, ve kterých je hlavním zástupcem FMO2 [4,30].

O inducibilitě FMO je zatím známo jen velmi málo, dokonce byly považovány na rozdíl od CYP za enzymy s konstitutivní expresí [37–39], a to až do roku 2008, kdy proběhla studie zkoumající indukci transkripce mRNA flavinových monooxygenas v myších játrech. Bylo prokázáno, že induktorem izoform FMO1, FMO2 a FMO3 je TCDD a že indukce probíhá pomocí Ah receptoru, tedy stejným mechanismem jako u CYP1A, respektive 1B1 [40]. Později byly zkoumány i další polycyklické aromatické uhlovodíky 3-methylcholanthren a benzo[a]pyren, které jsou typickými induktory CYP1, a i pomocí těchto látek byla prokázána indukce FMO v myších játrech [41].

V této diplomové práci jsou studovány izoformy FMO1 a FMO3, neboť se jedná o hlavní biotransformační enzymy také u studovaných potkanů. Na rozdíl od lidských FMO jsou u potkanů obě tyto izoformy exprimované jak v játrech, tak v ledvinách [42].

1.3 Inhibitory tyrosinkinas jako protinádorová léčiva

V posledních letech došlo k významnému pokroku ve vývoji specifických inhibitorů tyrosinkinas pro cílenou terapii rakoviny [1]. Velkým průlomem v této terapeutické oblasti bylo úspěšné použití léčiva imatinibu, který inhibuje aktivitu kinasové domény fúzního proteinu BCR-ABL, k léčbě chronické myeloidní leukemie v roce 2002 [43]. V současné době je schváleno a klinicky používáno více než 20 druhů tyrosinkinasových inhibitorů [44]. Proč jsou právě inhibitory tyrosinkinas využívány jako chemoterapeutika bude vysvětleno v následujících kapitolách.

1.3.1 Proteinové tyrosinkinasy

Proteinové tyrosinkinasy (PTK) jsou enzymy katalyzující přenos fosfátu z molekul ATP na tyrosinové zbytky proteinových substrátů. Tyrosinová fosforylace, ke které dochází v mnohobuněčných organismech v důsledku intracelulární komunikace, je jednou z klíčových kovalentních modifikací, díky které dochází k modulaci enzymové aktivity a tvorbě vazebných míst pro signalizační proteiny [45]. Tyrosinkinasy jsou zodpovědné za regulaci řady buněčných procesů včetně proliferace, diferenciace a apoptózy [46].

Neregulovaná aktivace těchto enzymů způsobená mechanismy, jako jsou bodové mutace nebo nadměrná exprese, může vést k celé řadě onemocnění, jako jsou například diabetes, imunitní nedostatečnost nebo různé formy maligní či benigní proliferace [47,48]. Uvádí se, že více než polovina z 90 identifikovaných lidských tyrosinkinas se podílí na rakovině, a to i přes fakt, že fosforylace tyrosinu představuje pouze 1 % z celkového fosfoproteomu [49]. PTK se dělí do dvou hlavních tříd – receptorové tyrosinkinasy (RTK) a buněčné neboli nereceptorové tyrosinkinasy (NRTK).

Třída receptorových tyrosinkinas zahrnuje receptory pro inzulin a mnoho růstových faktorů, jako je epidermální růstový faktor (EGF, z angl. epidermal growth factor), fibroblastový růstový faktor (FGF, z angl. fibroblast growth factor) nebo cévní endotelový růstový faktor (VEGF, z angl. vascular endothelial growth factor). RTK se skládají z domény vázající extracelulární ligand, intracelulární katalytické domény a transmembránové domény, která enzym zakotvuje v plazmatické membráně [47]. První fází aktivace RTK je vazba příslušného ligandu (například konkrétního růstového faktoru) na extracelulární doménu, což indukuje dimerizaci receptoru. Dimerizace tyrosinkinasy umožní tzv. křížovou fosforylaci, kdy se díky změně konformace oba monomery vzájemně autofosforylují. Následkem fosforylace tyrosinových zbytků dojde na intracelulární doméně k vytvoření nových vazebných míst pro signalizační molekuly obsahující domény s homologií k proteinu Src (SH2) nebo domény vázající fosfotyrosin (PTB), jejichž interakcí se spustí signální kaskáda uvnitř buňky [48,50].

Na rozdíl od RTK jsou nereceptorové tyrosinkinasy umístěny v cytoplazmě, v jádře nebo na vnitřní straně cytoplazmatické membrány a vykazují odlišnou kinasovou regulaci a funkční vlastnosti. Tato skupina enzymů má pouze intracelulární kinasovou doménu, ve většině případů však jejich aktivace probíhá stejně jako u RTK přes fosforylaci tyrosinových zbytků [47]. Největší podskupinou NRTK je rodina Src, do níž spadají kinasy jako B-lymfoidní tyrosinkinasa (Blk), Fyn, Fgr nebo prototypová kinasa c-scr [51]. Členové rodiny Src se účastní řady signalizačních procesů včetně mitogeneze, aktivace T- a B-buněk a restrukturalizace cytoskeletu, současně je však jejich aktivita spojována s karcinomy prsu, plic a tlustého střeva [52].

Za normálních okolností se tyrosinkinasy vyskytují v buňce bez přítomnosti ligandu v inaktivované (tedy nefosforylované) podobě. Enzym se aktivuje navázáním příslušného ligandu a následnou dimerizací a autofosforylací. Jak již však bylo řečeno, objevuje se několik mechanismů, které způsobují dysregulaci tyrosinkinasové aktivity, která může vést

ke vzniku rakoviny. Takovým mechanismem často bývá fúze receptorové i nereceptorové TK s partnerským proteinem v důsledku vyvážené chromozomální translokace. Partnerský protein zapříčiní oligomerizaci enzymu i v nepřítomnosti ligandu, čímž podpoří fosforylaci a aktivaci tyrosinkinasy [53]. Primárním příkladem tohoto mechanismu je fúze BCR-ABL, která byla implikována jako přímá příčina chronické myeloidní leukemie [54]. Druhým důležitým dysregulačním faktorem jsou mutace narušující autoregulaci kinasy. Tyto genové abnormality způsobí trvalou aktivaci enzymu, v případě malých delecí či bodových mutací dochází „pouze“ ke zvýšení citlivosti receptoru na příslušný ligand. Třetím neméně významným mechanismem je zvýšená nebo aberantní exprese receptoru TK, příslušného ligandu nebo obou. A konečně, zvýšená aktivita TK může být zapříčiněna narušením funkce fosfatasy, hydrolyzující fosforylovaný tyrosin, či sníženou expresí inhibitorů TK, jejichž úkolem je aktivitu enzymu omezovat [53].

1.3.2 Inhibitory tyrosinkinasy

Inhibitory tyrosinkinasy (TKI) jsou zpravidla malé organické sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností s horní hranicí 900 daltonů. TKI blokují životně důležité signální dráhy, které jsou nezbytné pro přežití buněk. Mohou translokovat přes plazmatickou membránu, interagovat s cytoplazmatickou doménou RTK a inhibovat katalytickou aktivitu enzymu interferencí s vazbou ATP nebo jeho substrátu [1]. Jiné TKI mohou působit mechanismem inhibice fúze tyrosinkinasy blokováním jejich dimerizace. Aktivaci TK lze dále zabránit použitím protilátek proti receptorům TK nebo jejich ligandům, čímž dojde k narušení signální dráhy, nebo snížením stability proteinu tepelného šoku 90 (Hsp 90, z angl. heat-shock protein 90) v případě, že je stabilita příslušné TK regulována vazbou právě na Hsp90 [53].

Inhibitory se mezi sebou liší jak strukturně, tak mechanismem působení, podle kterého jsou rozdělovány do tří hlavních skupin. Většina v současnosti používaných TKI jsou inhibitory působící kompetitivně k ATP a jsou klasifikovány jako inhibitory typu I. Třídy II a III nejsou konkurenty ATP, nýbrž indukují konformační změny v RTK tak, že dojde ke ztrátě kinasové aktivity. Mimo to se mohou tyto inhibitory vázat na tyrosinové zbytky tyrosinkinasy a bránit tak jejich fosforylaci [1].

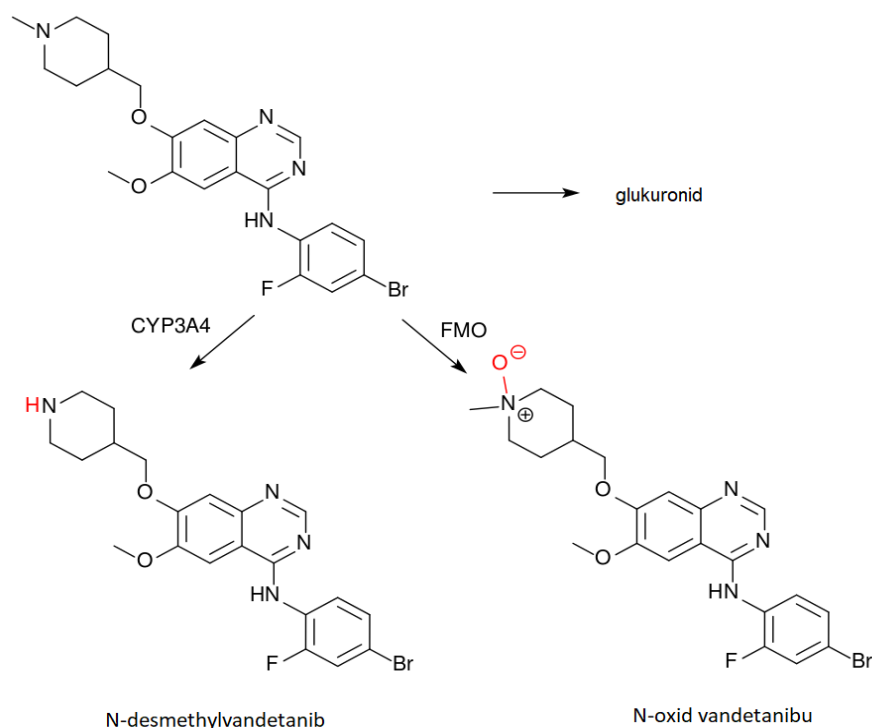
V laboratorní části mé diplomové práce byly zkoumány inhibitory vandetanib a lenvatinib, proto budou podrobněji popsány níže.

1.3.2.1 Vandetanib

Vandetanib (ZD6474) je perorálně podávané onkologické léčivo, patřící do třídy syntetických 4-anilinochinazolinů [55]. Jedná se o tyrosinkinasový inhibitor s vysokou selektivitou vůči receptorům cévního endoteliálního růstového faktoru 2 a 3 (VEGFR2 a 3, z angl. vascular endothelial growth factor receptor), receptorům epidermálního růstového faktoru (EGFR, z angl. epidermal growth factor receptor) a receptorům pro neurotrofický faktor odvozený od gliálních buněk (RET, z angl. glial cell-line derived neurotrophic factor receptor) [56–59]. Chemicky se jedná o látku se sumárním vzorcem $C_{22}H_{24}BrFN_4O_2$ o relativní molekulové hmotnosti 475,36 [60]. V současné době je vandetanib považován za účinnou látku při léčbě medulárního karcinomu štítné žlázy (MTC, z angl. medullary thyroid cancer). Protinádorový účinek tohoto tyrosinkinasového inhibitoru spočívá v jeho zásahu do signálních drah, které podporují buněčnou proliferaci, diferenciaci a angiogenezi při rakovině štítné žlázy [61].

In vitro studie ukázaly, že hlavními enzymy podílejícími se na metabolismu vandetanibu jsou CYP3A4 a FMO. Primárně je vandetanib biotransformován pomocí CYP3A4 na N-desmethylvandetanib. Druhým metabolitem vandetanibu je vandetanib-N-oxid, na který je léčivo oxidováno pomocí flavinových monooxygenas v ledvinách (FMO1) a v játrech (FMO3) (obrázek 3, strana 24) [62,63]. Biotransformace vandetanibu byla prokázána na zdravých mužských subjektech, kterým byl podáván radioaktivně značený vandetanib. Přítomnost metabolitů N-desmethylvandetanibu i N-oxid vandetanibu byla potvrzena v plazmě, moči i stolici jedinců [62,63].

N-desmethylvandetanib, metabolit cytochromu P450 3A4, má obdobnou farmakologickou aktivitu jako vandetanib, zatímco vandetanib-N-oxid, který vzniká oxidací pomocí FMO, je 50x méně účinný. Při léčbě onkologických onemocnění vandetanibem je tedy velmi důležité prozkoumat a zvážit vliv inhibice či indukce biotransformačních enzymů CYP3A4 a FMO, které mohou ostatní podávaná léčiva způsobovat. Studie zkoumající inhibici a indukci CYP3A4 prokázala, že při podání silného induktoru rifampicinu klesne expozice vandetanibu o 40 %, nicméně současná expozice metabolitu N-desmethylvandetanibu, který má podobnou účinnost, může do jisté míry kompenzovat sníženou expozici mateřské molekuly. V kombinaci s inhibitorem itakonazolem byla expozice vandetanibu zvýšena přibližně o 9 % [62]. Z uvedené studie vyplývá, že případná indukce nebo inhibice biotransformačních enzymů může mít na léčbu zásadní vliv.

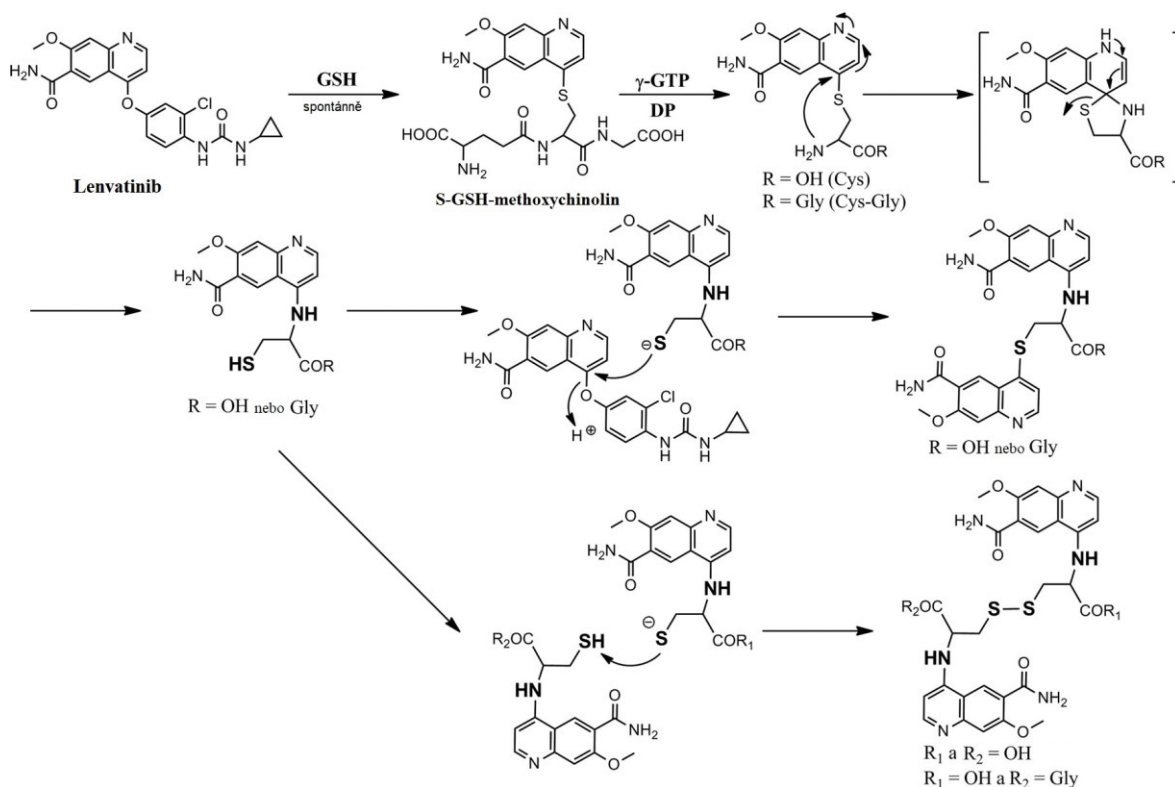


Obrázek 3: Schéma metabolismu vandetanibu v organismu. Vandetanib je biotransformován pomocí cytochromu P450 3A4 na N-desmethylvandetanib a pomocí flavinových monooxygenas na vandetanib-N-oxid. Převzato a upraveno z [64].

1.3.2.2 Lenvantinib

Lenvantinib mesylát (E7080) je inhibitor tyrosinkinasových domén receptorů cévního endoteliálního růstového faktoru 1-3 (VEGFR1-3), receptorů fibroblastového růstového faktoru 1-4 (FGFR1-4), receptorů destičkového růstového faktoru (PDGFR, z angl. platelet-derived growth factor receptor), receptorů pro neurotrofický faktor odvozený od gliálních buněk (RET) a cytokinových receptorů KIT [65]. Kinasová aktivita těchto receptorů způsobuje angiogenezi, která je nezbytná pro progresi nádorů a metastázi, jejich inhibice tedy zároveň progresi nádorů zamezí. Kromě bránění angiogeneze vykazuje lenvatinib přímý účinek na nádorové buňky tím, že inhibuje jejich migraci a invazi [66]. Lenvatinib je využíván v různých klinických studiích fáze II a fáze III jako perorálně podávané onkologické léčivo k biologické terapii mnoha typů nádorů, jako je hepatocelulární karcinom, melanom, karcinom ledvin, plic a dalších. V roce 2015 byla schválena léčba lenvatinibem u pacientů s pokročilým karcinomem štítné žlázy nereagujícím na léčbu jaderným zářením či radioaktivním jódem [67].

Biotransformace lenvatinibu byla demonstrována v roce 2011 na primátu makakovi obecném (obrázek 4). Studie prokázala, že lenvatinib byl v organismu konjugován s glutathionem za současné eliminace chlorfenoxyskupiny za vzniku S-GSH-methoxychinolinu a následně došlo k intramolekulárnímu přeskupení tohoto S-konjugátu na N-konjugát. N-metabolity následně vytvořily disulfidově vázané dimery, nebo podstoupily aromatické substituční reakce s nezměněným lenvatinibem. V rámci studie byl také zkoumán vliv enzymů na jednotlivé metabolické reakce. Bylo prokázáno, že konjugace lenvatinibu s GSH probíhá spontánně bez jakýchkoli příspěvků enzymů CYP nebo glutathion-S-transferasy (GST). Jako nezbytná k přemístění chlorfenoxyskupiny se však ukázala přítomnost volné sulfhydrylové skupiny a dále cysteinylové aminoskupiny potřebné k intramolekulárnímu přesmyku [68].



Obrázek 4: Schéma metabolismu lenvatinibu v organismu makaka obecného. Prvním krokem biotransformace lenvatinibu je spontánní konjugace s glutathionem za současné eliminace chlorfenoxyskupiny za vzniku S-GSH-methoxychinolinu. Následuje intramolekulární přeskupení tohoto S-konjugátu na N-konjugát. N-metabolity následně tvoří disulfidově vázané dimery, nebo podstoupí aromatickou substituční reakci s nezměněným lenvatinibem. Převzato a upraveno z [68].

Ke konjugaci lenvatinibu s glutathionem dochází v játrech, avšak enzymy dipeptidasy (DP) a γ -glutamyltranspeptidasa (γ -GTP) potřebné k intramolekulárnímu přeskupení jsou u makaků přítomny ve žlučníku, z čehož vyplývá, že biotransformace S-konjugátu pokračuje až po vyloučení do žluči. Výsledný dimerní metabolit nebyl zjištěn v játrech, proces dimerizace probíhá pouze za vysokých koncentrací ve žlučníku. Podobným biotransformačním procesem prochází léčivo v ledvinách, kde může dojít jak ke konjugaci s GST, tak k hydrolyze pomocí peptidas a k přesmyku. Dimerizace proběhne následně v močovém měchýři. Kromě toho dochází v ledvinách k tvorbě konjugátu kyseliny merkaptooctové, který vzniká oxidační deaminací a dekarboxylací S-cysteinového metabolitu generovaného z S-konjugátu GSH s lenvatinibem [68].

Další metabolická cesta lenvatinibu, která se vyskytuje u lidí, opic, psů i potkanů, vede k monooxidovaným metabolitům N-oxid lenvatinibu a O-desmethyllenvatinibu, které vznikají působením CYP [67]. Studium enzymů, které se na této biotransformační dráze podílejí, se ve dvě diplomové práci zabývala kolegyně Katarína Vavrová. Bylo zjištěno, že za oxidaci lenvatinibu na tyto dva metabolity jsou v potkaních jaterních mikrosomech zodpovědné především CYP 3A. Dalšími participujícími enzymy mohou být CYP 1A, 2B a 2C, ovšem v mnohem menší míře. Dále bylo zjištěno, že v lidských jaterních mikrosomech dochází k oxidaci lenvatinibu na O-desmethyllenvatinib a N-descyklopropyllenvatinib [69]. Za použití hmotnostní spektrometrie byly identifikovány další dva metabolity, chinolinonová forma lenvatinibu a chinolinonová forma desmethylovaného lenvatinibu, které se však vyskytovaly pouze v lidských a opičích jaterních frakcích. Studie dále prokázaly, že tyto metabolity se tvoří pomocí enzymů aldehydoxidas, které katalyzují oxidace aldehydů a azaheterocyklických derivátů na odpovídající karboxylové kyseliny a laktamy a které se právě specificky vyskytují u lidí a primátů [67,70].

1.4 Ellipticin

Ellipticin (5,11-dimethyl-6H-pyridol[4,3-b]karbazol) je jeden z nejjednodušších přirozeně se vyskytujících alkaloidů s rovinnou strukturou, nacházející se v rostlinách *Ochrosia elliptica* z rodiny *Apocyanaceae* [71]. Tato sloučenina a několik jejích derivátů (9-hydroxyellipticin, 9-hydroxy-N²-methylellipticinium, 9-chlor-N²-methylellipticinium, 9-methoxy-N²-methylellipticinium a 9-dimethyl-amino-ethoxy-ellipticin) prokázaly v preklinických a klinických studiích významné protinádorové účinky například proti

leukemii, melanomu B16, rakovině tlustého střeva, karcinomu plic, prsu, štítné žlázy, osteosarkomu a mnoha dalším [72].

Přestože se ellipticin jeví jako velmi účinná terapeutická látka proti mnoha typům rakoviny, jeho klinické použití značně omezeno pro jeho závažné nepříznivé vedlejší účinky, jako jsou nefrotoxicita, zažívací potíže (nevolnost a zvracení), hypertenze, svalové křeče, velmi výrazná únava apod. Zároveň bylo prokázáno, že se jedná o látku mutagenní [72]. Dalším problémem při klinické aplikaci ellipticinu je jeho hydrofobnost, která omezuje jeho průnik k nádorové tkáni a tím pádem jeho terapeutický účinek. Jedním z přístupů ke zmírnění těchto nežádoucích účinků je zapouzdření ellipticinu do vhodných nanočástic, což by zajistilo cílené dodávání ellipticinu do nádorové tkáně [73].

1.4.1 Mechanismus působení ellipticinu

Protinádorový terapeutický účinek ellipticinu spočívá v jeho schopnosti zásahu do rakovinného bujení hned na několika úrovních. Studie na lidských buňkách MCF-7 adenokarcinomu prsu ukázaly, že ellipticin zastavuje progresi buněčného cyklu díky modulaci hladin cyklinu B1, který hraje zásadní roli při přechodu z G2 fáze do mitotické fáze v buněčném cyklu, a cyklin-dependentní kinasy Cdc2, se kterou B1 asociuje, kdežto ellipticin ji dokáže inhibovat pomocí fosforylace [74].

Ellipticin je dále schopen iniciovat apoptózu, a to buď aktivací ligandového systému Fas/Fas, regulací proteinů rodiny Bcl-2 ("B-cell lymphoma") v několika typech nádorových buněk, nebo generací cytotoxických volných radikálů [75]. Tyto reaktivní formy kyslíku jsou silnými induktory apoptózy v mnoha buněčných systémech [76]. Oxidační stres indukuje řadu dějů vedoucích k apoptóze, jako je aktivace mitogenem aktivovaných proteinkinás, snížení mitochondriálních membránových potenciálů, uvolňování cytochromu c a faktoru indukujícího apoptózu (AIF, z angl. apoptosis-inducing factor) nebo aktivace kaspasy [77]. AIF se může translokovat do jádra, kde způsobí rozsáhlou fragmentaci DNA, a předpokládá se, že AIF je specifickým markerem apoptotické dráhy nezávislé na kaspase [78,79]. Působení ellipticinu také zasahuje do normální mitochondriální funkce a také vyvolává apoptotickou signalizaci zesílenou křížovou komunikací mezi receptorem smrti Fas a mitochondriální apoptotickou cestou [75].

Několik studií ukázalo zapojení tumor-supresorového proteinu p53 do ellipticinem zprostředkované indukce zastavení buněčného cyklu a apoptózy. Ellipticin a jeho derivát 9-hydroxyellipticin způsobují inhibici fosforylace proteinu p53 selektivní inhibicí kinasy

CDK2 v několika typech buněčných linií, jako je Lewisův plicní karcinom nebo karcinom tlustého střeva [72,75]. Apoptózu by taktéž mohla způsobit akumulace defosforylovaného proteinu p53 [80].

Všechny studie zkoumající působení elliptycinu jako protinádorového léčiva popisují komplexní dráhy vedoucí k apoptóze rakovinných buněk, přesto však nebyl doposud přesný molekulární mechanismus popsán. Předpokládá se však, že protinádorové a cytotoxické účinky elliptycinu jsou důsledkem buď interkalace do DNA, nebo inhibice aktivity DNA topoizomerasy II. Velikost a tvar elliptycinového chromoforu jsou podobné velikosti a komplementaritě párů bazí, polycyklický aromatický charakter molekuly alkaloidu může navíc vést k těsným interakcím s vhodnými oblastmi DNA. Oba tyto faktory poskytují příznivé podmínky pro interkalaci elliptycinu do DNA. Druhým pravděpodobným mechanismem je stimulace rozpadu DNA zprostředkovaného topoizomerasou II. Předpokládá se, že vznik ternárního komplexu mezi topoizomerasou II, DNA a elliptycinem vede k poškození nukleové kyseliny a následné apoptóze [72,75]. Jako důsledek mnohonásobného poškození DNA dojde navíc ke genotoxickému stresu, což způsobí zvýšení hladiny jaderného p53 [81], který se podílí na indukci zastavení buněčného cyklu, jak bylo popsáno výše. Všechny tyto skutečnosti naznačují, že poškození DNA vyvolané působením elliptycinu je klíčové pro jeho cytotoxické účinky.

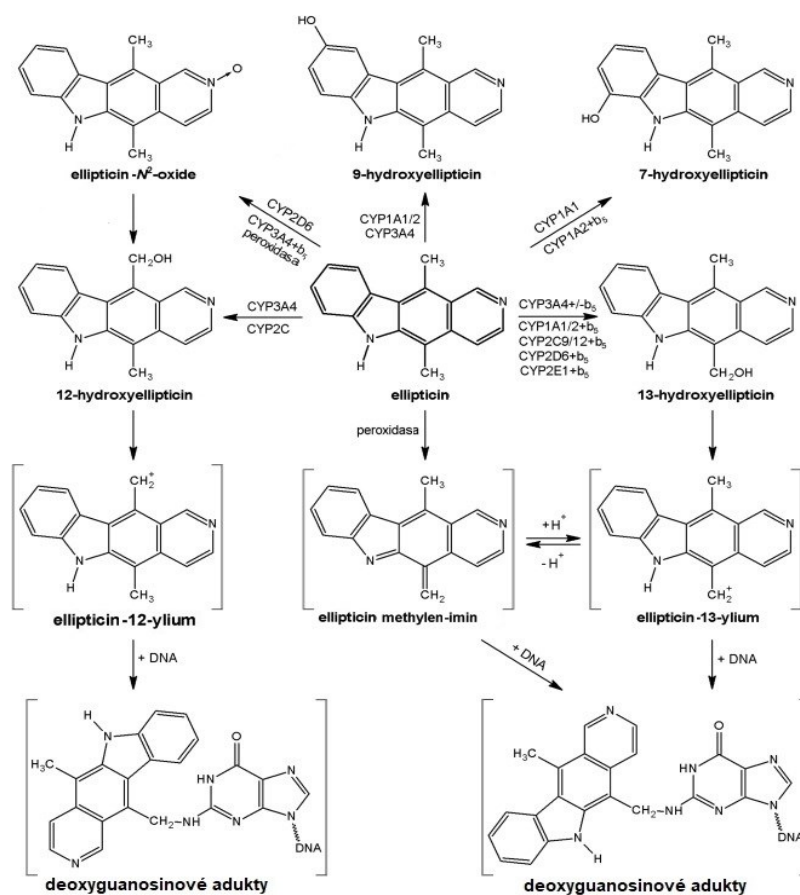
1.4.2 *Metabolismus elliptycinu*

Ellipticin podléhá v savčím organismu oxidačním reakcím za účasti enzymů CYP. Zatímco enzymy CYP1A1 a CYP1A2 primárně oxidují ellipticin na deriváty 9-hydroxy- a 7-hydroxyellipticin, což jsou detoxikační metabolity tohoto alkaloidu, nejaktivnější lidský enzym CYP3A4 ho s pomocí dalších izoform CYP přeměňuje na 12-hydroxy- a 13-hydroxyellipticin, schopné tvořit kovalentní adukty DNA [79,82]. Posledním metabolitem elliptycinu je N²-oxid elliptycinu, který je tvořen především CYP2D6 [73,75].

9-hydroxyellipticin je účinným inhibitorem transkripce polymerasou I *in vitro*, interkaluje do DNA a inhibuje aktivitu topoizomerasy II, je proto farmakologicky důležitým metabolitem [75]. 12-hydroxy- a 13-hydroxyellipticin jsou velmi aktivní metabolity, které se spontánně přeměňují na ellipticin-12-ylum a ellipticin-13-ylum reagující s DNA za vzniku dvou hlavních deoxyguanosinových aduktů [83]. Poslední metabolit ellipticin-N²-oxid je také velmi aktivní a přeměňuje se na 12-hydroxyellipticin. Schéma metabolismu elliptycinu je vyobrazeno na obrázku 5, strana 29.

Dalšími enzymy, které jsou schopné oxidovat ellipticin na jeho hydroxyderiváty, jsou peroxidasy, jako například lidská myeloperoxidasa, bovinní laktoperoxidasa, lidská cyklooxygenasa. Mechanismy oxidace peroxidasami se sice liší od oxidace cytochromy P450, metabolity jsou však opět schopné tvořit adukty DNA, a to přes meziprodukt ellipticin methylen-imin. Adukty derivátu ellipticinu s DNA se tvoří ve zdravých i nádorových buněčných liniích, ve zdravých tkáních však nepřetrvávají [73,75].

Veškeré studie ukazují, že ellipticin se jeví jako látka s velice vysokým protinádorovým potenciálem, který je navíc podporován a zvyšován oxidací na reaktivní metabolity pomocí enzymů CYP a peroxidas [72].



Obrázek 5: Schéma metabolismu ellipticinu v savčím organismu. Pomocí CYP1A1 a 1A2 je ellipticin oxidován primárně na své detoxikační metabolity 9-hydroxy- a 7-hydroxyellipticin. Dalšími metabolity, které vznikají za katalýzy CYP3A4 a dalších izoform CYP, jsou velmi aktivní 12-hydroxy- a 13-hydroxyellipticin, které se spontánně přeměňují na ellipticin-12-ylum a ellipticin-13-ylum. Tyto metabolity reagují s DNA za vzniku deoxyguanosinových aduktů. Posledním metabolitem ellipticinu je N²-oxid ellipticinu, na jehož vzniku se podílí především CYP2D6. N²-oxid je velmi aktivní a spontánně se přeměňuje na 12-hydroxyellipticin. Převzato a upraveno z [73].

2 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo charakterizovat vliv inhibitorů tyrosinkinasy vandetanibu a lenvatinibu, alkaloidu ellipticinu a jejich kombinací na genovou a proteinovou expresi a aktivitu cytochromů P450 1A1, 1A2 a 1B1 a flavinových monooxygenas FMO1 a FMO3 v modelovém organismu laboratorního potkana *in vivo*. O vlivu vandetanibu a lenvatinibu na expresi a aktivitu biotransformačních enzymů dosud nebylo nic známo, podrobněji byl zkoumán především metabolismus těchto látek.

Diplomová práce je součástí studie „*Komplexní pohled na mechanismus působení a metabolismus inhibitorů tyrosinkinasy a studium přístupů k potenciaci jejich protinádorové účinnosti*“ prováděné v rámci grantového projektu (GAČR:18-10251S). Navazuje na diplomovou práci Mgr. Sandry Jelínkové, v rámci které byl zkoumán vliv vandetanibu, lenvatinibu a ellipticinu na expresi a aktivitu potkaních cytochromů P450 1A a 3A v jaterní tkáni [84].

Hlavními úkoly práce bylo:

- Izolovat mikrosomy a RNA z ledvin potkanů kontrolní skupiny a skupin premedikovaných zkoumanými látkami
- Pomocí metody Western blot s následnou imunodetekcí porovnat množství CYP1A1/2 v mikrosomální frakci z ledvin a CYP1B1, FMO1 a FMO3 v mikrosomální frakci z ledvin a z jater potkanů kontrolní skupiny a skupin premedikovaných zkoumanými látkami
- Stanovit specifickou aktivitu CYP1A1/2 v mikrosomální frakci z ledvin a FMO1 a FMO3 v mikrosomální frakci z ledvin a z jater potkanů kontrolní skupiny a skupin premedikovaných zkoumanými látkami
- Pomocí kvantitativní PCR porovnat relativní míru genové exprese CYP1A1/2 v ledvinách a CYP1B1, FMO1 a FMO3 v ledvinách a v játrech potkanů kontrolní skupiny a skupin premedikovaných zkoumanými látkami

3 MATERIÁL

3.1 Přístroje a pomůcky

Analytické váhy

Discovery DV215CD

Ohaus, USA

Precisa 40SM-200A

Pesa, Švýcarsko

Aparatura pro agarosovou elektroforézu

Cleaver Scientific, UK

Aparatura pro metodu Western blot

Fastblot B43

Biometra, Německo

Trans-Blot Turbo Transfer System

Bio-Rad, USA

Aparatura pro SDS elektroforézu

Bio-Rad, USA

Centrifugy

Allegra X-30R

Beckman Coulter, USA

Centrifuge 5415 R

Eppendorf, Německo

Centrifuge 5418

Eppendorf, Německo

Centrifuge 5430

Eppendorf, Německo

Centrifuge Z 383 K

Hermle Labortechnik, Německo

EBA 270

Hettich, Německo

Microcentrifuge MiniStar

VWR, USA

Minicentrifuga Spectrafuge™

Labnet, Japonsko

Ultracentrifuga LE-80 K

Beckman Coulter, USA

HPLC systém

Agilent 1200 Series s DAD detektorem

Agilent, USA

Inkubátory

Mini Dry Bath Incubator

MIULAB, Čína

Termoblok LS 1

VLM, Německo

Thermomixer compact

Eppendorf, Německo

Kolona

Nucleosil 100-5, C18 (205 x 4 mm, 5µm)

Macherey-Nagel, Německo

Magnetická míchačka

C-MAG MS 4

IKA, Německo

pH metr

HI-2211

HANNA Instruments, USA

Předvážky

KERN 440-35A, 440-35N

Kern & Sohn GmbH, Německo

KERN EMS 6K0.1

Kern & Sohn GmbH, Německo

Spektrofotometry

Specord® 250 Plus

Analytik Jena, Německo

Spektrofotometr DS-11

DeNovix, USA

Tecan Infinite M200 Pro, microplate reader

Tecan, Švýcarsko

Třepačky

MR-1 MiniRocker-Shaker

Biosan, Litva

WiseShake SHO-2D

Witeg, Německo

Vortexy

Genius 3

IKA, Německo

GV Lab

GILSON, USA

MS1 Minishaker

IKA, Německo

Zdroje napětí

Electrophoresis Power Supply EPS 30

Amersham Pharmacia Biotech,
USA

PowerPack™ Basic Power Supply

Bio-Rad, USA

Další přístroje

Laminární box

Labox, ČR

PCR cycler Techgene

Techne, UK

Real-Time System CFX Connect

Bio-Rad, USA

Transiluminator, Dark Reader DR-45M

Clare chemical research, USA

Vodní lázeň BS-11

JEIO TECH, Korea

3.2 Materiál a chemikálie

Applied Biosystems, USA: High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit,

BD Gentest™, USA: potkaní rekombinantní cytochrom P450 1A1, 1A2 a 1B1 v Supersomech™, potkaní FMO1 a FMO3 v Supersomech™

BIO-RAD, USA: persíran amonný (APS), Laemmli Sample Buffer (4x), Precision Plus Protein™ Dual Color Standards

Boster Biological Technology, USA: primární protilátka anti-CYP1B1 Picoband™ králičí

Daiichi Pure Chemicals, Japonsko: primární protilátka anti-CYP1A1 koží

Fluka, Švýcarsko: akrylamid, azid sodný, bisakrylamid, tokoferol (vit. E)

Geneaid, Taiwan: GENEzol™

IDT, USA: IDT sondy pro β -aktin, CYP1A1, 1A2 a 1B1, FMO1 a FMO3, Hprt1

Invitrogen, UK: agarosa

Laboratoř prof. RNDr. Petra Hodka, CSc.: anti-CYP1A2 slepičí

LC-Laboratories, USA: lenvatinib, vandetanib

Lach-Ner, ČR: bromfenolová modř, difosforečnan tetrasodný, dihydrogenfosforečnan draselný, dihydrogenfosforečnan sodný, dithioničitan sodný, ethanol, glycerol, glycin, hexahydrát chloridu hořečnatého, hydrogenfosforečnan draselný, hydrogenfosforečnan sodný, chlorid draselný, chlorid sodný, kyselina chlorovodíková, kyselina octová, methanol, sacharosa

Laktino, ČR: sušené mléko

Linde, ČR: kapalný dusík, oxid uhelnatý

Loba-Chemie, Indie: Ponceau barva

Merck KGaA, Německo: přenosová membrána Immobilon®-PSQ typu PVDF

MyBioSource, USA: primární protilátka anti-FMO1 králičí, primární protilátka anti-FMO3 králičí

New England BioLabs, USA: Gel Loading Dye (6x), RNA Loading Dye (2x), ss RNA Ladder

P-LAB, ČR: fenylmetansulfonyl fluorid (PMSF)

Promega Corporation, USA: BCIP, NBT

Roche, Švýcarsko: FastStart Essential DNA Probes Master, NADPH

Serva, Německo: Coomassie brilliant blue R-250, dithiotreitol (DTT)

Sevapharma, ČR: bovinní sérový albumin (BSA)

Sigma-Aldrich, USA: 7-ethoxyresorufin, 7-methoxyresorufin, primární protilátka anti-GAPDH králičí, sekundární protilátka anti-chicken s alkalickou fosfatasou, sekundární protilátka anti-goat s alkalickou fosfatasou, anti-rabbit s alkalickou fosfatasou, dimethylsulfoxid, ellipticin, fenacetin, glukosa-6-fosfát, glukosa-6-fosfát dehydrogenasa, NADP⁺, methyl p-tolyl sulfid, resorufin, SDS, TEMED, Tris-HCl, Triton X-100

ThermoFisher Scientific, USA: Microplate BCA Protein Assay Kit, PVDF membrána, SYBRTM Green II

VWR Chemicals, Francie: acetonitril, methanol (pro HPLC)

4 METODY

4.1 Premedikace experimentálních zvířat

Potkani kmene Wistar byli vystaveni jednorázovému působení inhibitorů tyrosinkinas lenvatinibu nebo vandetanibu, které byly podány gaváží do žaludku, intraperitoneálně podaného alkaloidu ellipticinu či jejich kombinací (viz tabulka 1). Inhibitory tyrosinkinas byly rozpuštěny v 1% roztoku Tween 80, ellipticin byl rozpuštěn ve vodě s takovým množstvím kyseliny octové, ve kterém bylo dosaženo úplného rozpuštění alkaloidu (~ 1% roztok kyseliny octové). Kontrolní skupině potkanů byla podána použitá rozpouštědla – gaváží do žaludku 1% roztok Tween 80 a intraperitoneálně 1% roztok kyseliny octové. V každé skupině byli 4 potkani.

Tabulka 1: Schéma aplikace látek podávaných laboratorním potkanům

| aplikovaná látka (označení skupiny) | dávkování |
|-------------------------------------|--|
| kontrola (KON) | rozpouštědla |
| vandetanib (VAN) | 30 mg vandetanibu/kg |
| lenvatinib (LEN) | 30 mg lenvatinibu/kg |
| ellipticin (ELLI) | 10 mg ellipticinu/kg |
| vandetanib + ellipticin (V+E) | 30 mg vandetanibu + 10 mg ellipticinu/kg |
| lenvatinib + ellipticin (L+E) | 30 mg lenvatinibu + 10 mg ellipticinu/kg |

Následující den po premedikaci byli potkani usmrceni a byly jim odebrány plíce, játra a ledviny, které byly zmrazeny a uchovány při teplotě -80 °C. V rámci této diplomové práce byly prováděny experimenty primárně s ledvinami, některé pokusy také s játry.

Experimenty byly realizovány v souladu se Zákonem na ochranu zvířat proti týrání (č. 409/2008 Sb.) a vyhláškou O chovu a využití pokusných zvířat č.419/2012 Sb. v prostoru Státního zdravotnického úřadu (Šrobárova 49/48, Praha 10).

4.2 Izolace mikrosomů

Použité roztoky

Pufr P1: 153 mmol/l KCl, 10 mmol/l EDTANa₂, 0,5 mmol/l PMSF, 50 μmol/l vit. E, pH 7,5

Pufr P2: 0,1 mol/l Na₄P₂O₇ · 10 H₂O, 0,1 mol/l KCl, 1 mmol/l EDTANa₂, pH 7,5

Pufr P3: 0,25 mol/l sacharosa, 1 mmol/l EDTANa₂, 1 mmol/l PMSF, 1 mmol/l DTT, 250 μmol/l vit. E, pH 7,5

Izolace mikrosomů byla prováděna podle postupu popsaneho v práci Lindström-Seppä [85]. Celý proces byl prováděn v chlazené místnosti při teplotě 5 °C a používané roztoky a pomůcky byly předem vychlazeny.

Pro izolaci ledvinných mikrosomů byly ledviny potkanů stejné premedikační skupiny spojeny. Zmražené orgány byly nejemno nastříhány do předem zváženého pufru P1. Z nárůstu hmotnosti byla určena hmotnost tkáně. Tkáň byla tímto pufrem několikrát promyta. Odkrvená tkáň byla homogenizována nejdříve ve volnějším a následně těsnějším homogenizátoru s teflonovým pístem na motorový pohon s objemem pufru P1 odpovídajícím čtyřnásobku hmotnosti ledvin. Homogenát byl přefiltrován přes 4x složenou gázu a centrifugován při 600x g po dobu 10 minut při současném chlazení na 4 °C (centrifuga Z 383 K, Hermle Labortechnik). Supernatant byl uchován na ledu pro další použití. Peleta byla rehomogenizována v ¼ původního objemu pufru P1 a dále zpracována za výše uvedených podmínek.

Spojené supernatanty byly odstředovány po dobu 20 minut při 15 000x g (centrifuga Allegra X-30R, Beckman Coulter). Supernatanty byly následně odlity přes sediment bez kontaminace lehce usazenou vrstvou mitochondrií. Jejich centrifugací po dobu 65 minut při 100 000x g (ultracentrifuga LE-80K, Beckman Coulter) byla ze supernatantů získána cytosolární frakce, která byla rozpipetována na alikvoty, zmrazena v kapalném dusíku a uchována v -80 °C. Peleta byla resuspendována a homogenizována v roztoku pufru P2 v objemu odpovídajícím asi dvojnásobku hmotnosti tkáně. Suspenze byla opět odstředována 65 minut při 100 000x g. Po odstranění supernatantu byla mikrosomální peleta homogenizována v pufru P3 v objemu odpovídajícím ¼ hmotnosti tkáně. Takto vzniklá mikrosomální frakce byla rozpipetována na alikvoty (~ 100 μl), zmrazena v kapalném dusíku a uchována v hlubokomrazícím boxu (-80 °C).

4.3 Stanovení množství proteinů

Množství proteinů v mikrosomálních frakcích bylo stanoveno podle návodu komerčního setu Microplate BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific, USA) [86], který obsahoval dvě činidla – činidlo A (2% $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,95% NaHCO_3 , 0,4% NaOH , 0,16% vínan sodno-draselný) a činidlo B (4% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$).

Ke stanovení koncentrace proteinů ve vzorcích se při této metodě využívá bicinchoninová kyselina (BCA, z angl. bicinchonin acid), která při alkalické redukci měďnatého iontu poskytuje s Cu^+ fialový komplex. Tento barevný komplex je spektrofotometricky měřen při vlnové délce 562 nm. Studie prokázaly, že při provádění reakce při 37 °C jsou za redukci Cu^{2+} na Cu^+ zodpovědné aminokyseliny tryptofan a tyrosin a peptidová vazba. Získaná absorbance je tedy přímo úměrná koncentraci proteinů [87,88].

Ledvinné mikrosomy byly 20x ředěny vodou. Do mikrotitrační destičky bylo pipetováno 7 μl destilované vody (slepý vzorek), standardů BSA o koncentracích 2; 1,5; 1; 0,75; 0,5; 0,25 a 0,125 mg/ml a 20x ředěných vzorků mikrosomů. Bylo přidáno 195 μl roztoku činidla, které obsahovalo 50 dílů činidla A a 1 díl činidla B. Vzorky byly 1 minutu promíchávány na třepačce a inkubovány po dobu 30 minut při 37 °C. Po inkubaci byly vzorky ponechány 5 minut při laboratorní teplotě a následně byla měřena absorbance při vlnové délce 562 nm na přístroji Tecan Sunrise. Koncentrace proteinů byly stanoveny ve třech paralelních vzorcích z jednotlivých mikrosomálních frakcí.

Z kalibrační křivky sestavené z hodnot absorbance standardů BSA byly vypočítány koncentrace proteinů v jaterních mikrosomálních frakcích.

4.4 Stanovení množství cytochromu P450

Použité roztoky

Pufř pro stanovení koncentrace CYP: 0,1 mol/l KH_2PO_4 , 20% (v/v) glycerol, pH 7,5

Stanovení množství cytochromu P450 v ledvinných mikrosomálních frakcích bylo provedeno metodou diferenčních spekter s využitím faktu, že CYP v redukovaném stavu vykazuje v komplexu s CO výrazné absorpční maximum při vlnové délce 450 nm [9].

Mikrosomální frakce byla vhodně naředěna pufrem pro stanovení koncentrace CYP na celkový objem 2 ml. Následně byly přidány přibližně 2 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, který je silným redukčním činidlem. Směs byla rovnoměrně po 1 ml rozdělena do dvou kyvet o optické

dráze 1 cm. Na dvoupaprskovém spektrofotometru Specord® 250 Plus byla proměřena základní linie v rozsahu 400-500 nm. Obsah měřící kyvety byl následně probubláván oxidem uhelnatým po dobu 60 sekund a poté bylo opět proměřeno diferenční absorpční spektrum v rozsahu 400-500 nm.

Ze získaných dat byla vypočítána koncentrace cytochromu P450 pomocí vzorce:

$$c_{\text{CYP}} = \left(\frac{A_{450} - A_{490}}{l \cdot \varepsilon} \right) \cdot \text{ředění} \quad [c] = \mu\text{M},$$

kde c_{CYP} představuje molární koncentraci cytochromu P450, A_{450} a A_{490} absorbance cytochromu P450 při vlnových délkách 450 a 490 nm, l optickou dráhu kyvety [cm] a ε molární extinkční koeficient [$0,091 (\mu\text{mol/l})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$].

4.5 SDS-PAGE elektroforéza

Použité roztoky

10% (w/v) APS

10% (w/v) SDS

Pufr A: 1,5 mol/l Tris-HCl, pH 8,8

Pufr B: 1,0 mol/l Tris-HCl, pH 6,8

Polymerační roztok: 29% (w/v) akrylamid, 1% (w/v) bisakrylamid

Elektrodový pufr: 0,192 mol/l glycin, 0,025 mol/l Tris-HCl, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,3

Redukující vzorkový pufr 4x koncentrovaný (Laemmli Sample Buffer, Bio-Rad)

Barvicí lázeň: 9,2% (v/v) kyselina octová, 0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB), 46% (v/v) ethanol

Odbarvovací lázeň: 10% (v/v) kyselina octová, 25% (v/v) ethanol

Gely

10% separační gel (pro 1 gel): 1,9 ml destilované vody, 1,7 ml polymeračního roztoku, 1,3 ml pufru A, 50 μl 10% SDS, 2 μl TEMED, 50 μl 10% APS

4% zaostřovací gel (pro 1 gel): 1,5 ml destilované vody, 267 μl polymeračního roztoku, 250 μl pufru B, 20 μl 10% SDS, 2 μl TEMED, 20 μl 10% APS

Tato metoda byla prováděna podle postupu popsaného v práci Laemmliho [89].

Skla pro nalévání gelů a hřebeny pro vytvoření komůrek byly důkladně omyty a odmaštěny ethanolem. Po oschnutí byla sestavena aparatura pro vertikální uspořádání

elektroforézy. Pro každou sadu vzorků byly připraveny dva gely. Nejdříve byl připraven spodní 10% separační gel, který byl převrstven destilovanou vodou a ponechán 30 minut za laboratorní teploty. Po ztuhnutí gelu byla voda vylita a prostor nad gelem byl vysušen filtračním papírem. Na separační gel byl nalit vrchní 4% zaostřovací gel, do kterého byl ihned vložen hřeben pro vytvoření 10 jamek pro vzorky. Po ztuhnutí vrchního gelu (cca 20 minut) byla skla s gelem vložena do elektrodové vany, z vrchního gelu byl vyjmut hřeben a do horního prostoru byl nalit elektrodový pufr.

Mezitím byly připraveny vzorky pro elektroforézu. Mikrosomy byly nejprve vhodně naředěny destilovanou vodou tak, aby množství proteinu aplikovaného na jamku činilo 75 µg nebo 100 µg s ohledem na příslušný analyzovaný enzym. K mikrosomům byl přidán 4x koncentrovaný redukující vzorkový pufr. Vzorky byly následně promíchány a povařeny 5 minut na vodní lázni. Pomocí automatické pipety s dlouhou špičkou byly jednotlivé vzorky aplikovány po 20 µl do jamek.

Do spodního prostoru aparatury byl nalit elektrodový pufr a byla spuštěna elektroforéza, která probíhala při napětí 200 V po dobu 80 minut, dokud čelo nedosáhlo spodního okraje gelu. Jeden z gelů byl ponořen do barvicí lázně a po 45 minutách přemístěn do lázně odbarvovací, ve které byl ponechán přes noc za neustálého třepání na třepačce (odbarvovací lázeň byla dvakrát vyměněna). Druhý gel byl použit pro přenos separovaných proteinů na membránu metodou Western blot.

4.6 Přenos proteinů metodou Western blot a imunodetekce

Použité roztoky

Přenosový pufr obsahující 20 % methanolu: 0,192 mmol/l glycin, 0,025 mmol/l Tris-HCl, 20% (v/v) methanol, pH 8,3

Ponceau červeň: 0,5% Ponceau, 1% kyselina octová

Pufr PBS-Triton X-100: 0,134 mol/l NaCl, 1,8 mmol/l Na₂HPO₄, 1,0 mmol/l NaH₂PO₄, 0,3% (w/v) Triton X-100

Blokovací roztok: 5% (w/v) roztok sušeného mléka v pufru PBS-Triton

Vyvíjecí ALP pufr: 100 mmol/l Tris-HCl, 150 mmol/l NaCl, 1 mmol/l MgCl₂ · 6 H₂O, 10 mmol/l NaN₃, pH 9,0

Vyvolávací roztok pro alkalickou fosfatasu: 10 ml vyvíjecího ALP pufru, 66 µl NBT, 33 µl BCIP

Primární protilátky:

anti-CYP1A1 kozí, ředěná 1:1 000 blokovacím roztokem

anti-CYP1A2 slepičí, ředěná 1:1 000 blokovacím roztokem

anti-CYP1B1 králíčí, ředěná 1:1 000 blokovacím roztokem

anti-FMO1 králíčí, ředěná 1:3 000 blokovacím roztokem

anti-FMO3 králíčí, ředěná 1:1 000 blokovacím roztokem

anti-GAPDH králíčí, ředěná 1:5 000 blokovacím roztokem

Sekundární protilátky:

anti-chicken IgG s alkalickou fosfatasou, ředěná 1:1 000 blokovacím roztokem

anti-goat IgG s alkalickou fosfatasou, ředění 1:2 500 blokovacím roztokem

anti-rabbit IgG s alkalickou fosfatasou, ředění 1:10 000 blokovacím roztokem

Princip

Western blot je analytická metoda, jejímž základem je přenos molekul proteinů pomocí elektrického proudu z gelu, ve kterém jsou proteiny separovány na základě své molekulové hmotnosti pomocí elektroforézy, na nitrocelulosovou nebo PVDF membránu. Detekce hledaného proteinu byla provedena pomocí imunodetekce – primární protilátka reaguje s antigenem (detekovaným proteinem) za tvorby imunokomplexu antigen-protilátka. Aplikovaná sekundární protilátka, která nese detekovatelný enzym (v našem případě alkalická fosfatasa), rozezná primární protilátku a naváže se na ni [90].

Postup

Tato metoda vycházela z postupů doporučených v instrukcích k aparaturám pro přenos proteinů metodou Western blot Fastblot B43 (Biometra) [91] a Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad) [92]. Jednotlivé kroky byly upravovány ve snaze metodu přenosu optimalizovat, níže je uveden postup s nejvhodnějšími podmínkami.

Před ukončením elektroforézy byly nastříhány chromatografické papíry Whatman Grade 3 ChR a polyvinylidenfluoridová (PVDF) membrána odpovídající velikosti gelu. PVDF membrána byla před elektropřenosem máčena 30 s v methanolu, přibližně 1 minutu v destilované vodě a následně 10 minut v transferovém pufru. Nastříhané chromatografické papíry Whatman byly namočeny do přenosového pufru. Po ukončení elektroforézy byl jeden gel inkubován 5 minut v přenosovém pufru.

Následně byl sestaven aparát pro elektropřenos. Na blotovací zařízení bylo umístěno 5 chromatografických papírů, na ně PVDF membrána, gel po elektroforéze a inkubaci v přenosovém pufru a nakonec opět 5 chromatografických papírů. Elektropřenos probíhal 40 minut při nastavení elektrického proudu o velikosti 5 mA/cm^2 gelu.

Po skončení elektropřenosu byl gel umístěn na 45 minut do barvicí lázně a následně do lázně odbarvovací. Membrána byla pro kontrolu přenosu proteinů ponořena na 20 s do roztoku Ponceau červeně. Pro odstranění barviva byla membrána důkladně promyta destilovanou vodou. Po odbarvení byla membrána inkubována 1 hodinu v blokovacím roztoku. Následně byla membrána rozstříhnuta podle standardu molekulových hmotností mezi hodnotami 37 kDa a 50 kDa tak, aby jedna část membrány obsahovala detekované enzymy, jejichž molekulová hmotnost se pohybuje mezi 57 kDa a 60 kDa, a druhá část glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasu (GAPDH) o molekulové hmotnosti 36 kDa. Imunodetekce GAPDH, která je v organismu exprimována konstitutivně, byla využita jako kontrola množství aplikovaných mikrosomálních proteinů. Vrchní část membrány byla ponořena do roztoku primární protilátky proti sledovanému enzymu v blokovacím roztoku a spodní část do roztoku primární králičí protilátky proti GAPDH. Inkubace membrán probíhala v chladové místnosti přes noc na třepačce.

Následující den byly membrány třikrát po 5 minutách promyty blokovacím roztokem. Poté byly vloženy do roztoků příslušných sekundárních protilátek, v nichž byly 1 hodinu inkubovány na třepačce při laboratorní teplotě. Po inkubaci byly membrány promyty dvakrát po 5 minutách v blokovacím roztoku, dvakrát po 5 minutách v pufru PBS-Triton a 5 minut v destilované vodě.

Přenesené proteiny byly vizualizovány pomocí vyvíjecího roztoku, ve kterém byly membrány smáčeny, dokud se neobjevily proužky detekovaných proteinů. Vyvolávání bylo zastaveno namočením membrán do destilované vody. Následně byly membrány osušeny mezi filtračními papíry a oskenovány.

4.7 Stanovení aktivity CYP1A1 – *O*-deethylace 7-ethoxyresorufinu

Ke stanovení aktivity cytochromu P450 1A1 v ledvinných mikrosomech byla využita markerová reakce *O*-deethylace 7-ethoxyresorufinu (EROD). Tento enzym, a s menším příspěvkem také CYP1A2, katalyzuje deethylaci 7-ethoxyresorufinu na fluorescenční produkt resorufin [93].

Složení inkubační směsi (200 μ l):

- 0,1 mol/l $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH 7,4
- 2 μ mol/l 7-ethoxyresorufin (zásobní roztok 0,2 mmol/l v DMSO)
- 0,5 mmol/l NADPH (zásobní roztok 5 mmol/l)
- vhodně naředěné ledvinné mikrosomy

Ledvinné mikrosomy byly naředěny fosfátovým pufrém tak, aby enzymová reakce probíhala kinetikou 0. řádu a nárůst fluorescence, který byl způsoben tvorbou fluorescenčního produktu resorufinu, byl lineární. Koncentrace proteinů mikrosomů z kontrolní skupiny a mikrosomů premedikovaných vandetanibem a lenvatinibem v inkubační směsi odpovídala 0,5 mg/ml. Mikrosomální frakce z potkanů premedikovaných ellipticinem a kombinacemi ellipticinu s inhibitory tyrosinkinas musely být kvůli nelineárnímu nárůstu fluorescence ředěny na koncentraci proteinu 0,01 mg/ml.

Z fosfátového pufru, vhodně naředěných mikrosomů a roztoku 7-ethoxyresorufinu byla připravena preinkubační směs, která byla temperována při teplotě 37 °C po dobu 10 minut. Následně byla směs rozpipetována po 180 μ l do čtyř jamek mikrotitrační destičky. Do třech jamek bylo přidáno 20 μ l 5mM NADPH, do čtvrtého vzorku, který sloužil jako kontrola, byl místo roztoku NADPH přidán pufr. Ihned byla měřena fluorescence resorufinu (TECAN Infinite M200 Pro) po dobu 10 minut v jednominutových intervalech při excitační vlnové délce 530 nm a emisní vlnové délce 585 nm. Množství resorufinu bylo odečteno z kalibrační křivky závislosti fluorescence na látkovém množství resorufinu. Kalibrační roztoky (látkové množství resorufinu 0, 2, 4, 8, 16, 24, 32, 40, 60, 80, 100, 120 a 160 pmol) byly připraveny z 10 μ M zásobního roztoku resorufinu v DMSO ředěním vzorkovým pufrém.

4.8 Stanovení aktivity CYP1A2 – *O*-demethylace 7-methoxyresorufinu

Ke stanovení aktivity cytochromu P450 1A2 v ledvinných mikrosomech byla využita *O*-demethylace 7-methoxyresorufinu (MROD). Tento enzym katalyzuje demethylaci 7-methoxyresorufinu na fluorescenční produkt resorufin [94].

Složení inkubační směsi (200 µl):

- 0,1 mol/l $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH 7,4
- 2 µmol/l 7-methoxyresorufin (zásobní roztok 0,2 mmol/l v DMSO)
- 0,5 mmol/l NADPH (zásobní roztok 5 mmol/l)
- vhodně naředěné ledvinné mikrosomy

Postup byl analogický k měření aktivity CYP1A1 metodou EROD (kapitola 4.7, strana 42), rozdíl byl pouze v použitém substrátu.

4.9 Stanovení aktivity FMO – oxidace methyl-p-tolyl sulfidu

Ke stanovení aktivity flavinových monooxygenas v ledvinných a jaterních mikrosomech byla využita oxidace methyl-p-tolyl sulfidu (MTS) na methyl-p-tolyl sulfoxid, která by měla být v alkalickém prostředí pro FMO specifická. Postup vycházel z komerčního návodu pro stanovení aktivity lidských rekombinantních FMO v SupersomechTM [95,96], neboť podobné postupy jsou využívány pro stanovení aktivity FMO také v potkaních a myších mikrosomech a dalších organismech [97–100].

Složení inkubační směsi (250 µl):

- 50 mmol/l glycinový pufr (pH 9,5)
- 2,0 mmol/l methyl p-tolyl sulfid (200 mmol/l zásobní roztok v methanolu)
- 1 mmol/l NADPH generující systém (10 mmol/l NADP^+ , 100 mmol/l MgCl_2 , 100 mmol/l glukosa-6-fosfát, 10 U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa)
- ledvinné/jaterní mikrosomy o koncentraci proteinů 1 mg/ml

Pro každou skupinu potkaních mikrosomů byla připravena preinkubační směs obsahující glycinový pufr, MTS a mikrosomy do 4 mikrozkmavek. Vzorky byly

temperovány při teplotě 37 °C po dobu 5 minut. Následně bylo do 3 mikrozkušavek po 3 paralelní stanovení přidáno 25 µl roztoku NADPH generujícího systému, pomocí kterého byla spuštěna reakce. Do čtvrtého vzorku, který sloužil jako kontrola, byl místo roztoku generujícího systému přidán pufr. Reakční směs byla inkubována po dobu 8 minut ve vodní lázni s třepáním o teplotě 37 °C. Reakce byla zastavena přidáním 75 µl ledového acetonitrilu. Vzorky byly promíchány na vortexu a centrifugovány po dobu 5 minut při 10 000x g (Centrifuge 5418, Eppendorf). Pro analýzu metabolitů bylo odebráno 250 µl supernatantu.

Metabolity byly separovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s UV/VIS detekcí při 45 °C za použití kolony Nucleosil 100-5, C18. Mobilní fáze byl na počátku 46% (v/v) methanol, jehož koncentrace vzrůstala během 7 minut na 55% (v/v) a následně od 7. do 25. minuty na 100% (v/v) methanol. Rychlost průtoku mobilní fáze kolonou byla nastavena na 1 ml/min, nástřik na kolonu činil 50 µl. Produkt byl detekován při vlnové délce 237 nm.

4.10 Izolace RNA

Při izolaci RNA je potřeba dodržovat zásady sterility práce, neboť se jedná o vysoce nestabilní nukleovou kyselinu, která může být jednoduše degradována všudypřítomnými ribonukleasami (RNasami). Pro izolaci RNA z ledvinné tkáně byly používány sterilní "RNase free" špičky s filtry a plastové mikrozkušavky, komerční činidlo GENEzol™ obsahující fenol, chloroform a guanidin isothiokyanát a dále bylo postupováno podle komerčního kitu Direct-zol™ RNA MiniPrep Plus od společnosti Zymo research [101]. Veškerá práce při izolaci RNA byla prováděna v laminárním boxu.

Třecí misky s tloučky, pinzety a špachtle byly omyty 10% peroxidem vodíku, zabaleny do alobalu a vloženy do sušárny o teplotě 180 °C na 6 hodin. Laminární box byl před zahájením izolace vytřen 10% peroxidem vodíku. Pipety, stojánky na mikrozkušavky a minicentrifuga byly otřeny 70% ethanolem a společně s potřebnými nástroji byly vloženy do laminárního boxu, který byl následně vysvícen UV světlem po dobu 15 minut.

Kousky ledvin potkanů z jednotlivých premedikačních skupin byly spojeny (celková hmotnost spojených kousků tkáně činila přibližně 200 mg) a následně homogenizovány v kapalném dusíku v třecí misce s tloučkem. Vzniklý homogenát byl rozdělen do 4 mikrozkušavek obsahujících 0,5 ml komerčního činidla GENEzol™ pro 4 paralelní izolace. Směs byla promíchána na vortexu a 5 minut inkubována při laboratorní teplotě. Pro odstranění nerozpuštěných částic byla před dalšími izolačními kroky provedena

centrifugace při 16 000x g po dobu 10 minut (Centrifuge 5415, Eppendorf) a supernatant byl odebrán do čisté mikrozkušavky.

Následně bylo postupováno podle manuálu ke komerčnímu kitu Direct-zol™ MiniPrep Plus. Do mikrozkušavek se supernatanty bylo přidáno množství 96% ethanolu odpovídající objemu supernatantu (450 µl) a vzorky byly promíchány na vortexu. Směs byla ve dvou krocích nanášena na kolonku Zymo-spin. Kolonky byly umístěny do sběrných zkumavek a centrifugovány při 16 000x g po dobu 30 s. Po přefiltrování byla sběrná zkumavka vyprázdněna, na kolonku byl nanášen zbytek směsi a centrifugace byla zopakována. Následně byly kolonky umístěny do nových sběrných zkumavek a za stejných centrifugačních podmínek byly promyty 400 µl "RNA Wash" pufru, přefiltrovaný roztok byl opět vylit. Na kolonky bylo nanášeno 80 µl směsi DNasy I (6U/µl) rozpuštěné v "DNA Digestion" pufru v poměru 1:35. Po 15 minutách inkubace při laboratorní teplotě byly kolonky dvakrát promyty 400 µl "RNA Prewash" pufrem, opět za stejných centrifugačních podmínek. Na závěr byly kolonky promyty 700 µl "RNA Wash" pufru a centrifugovány při 16 000 x g po dobu 2 minut a po vyprázdnění sběrných zkumavek ještě 30 sekund pro úplné odstranění promývacích pufků. Kolonky byly umístěny do "RNase free" mikrozkušavek. RNA zachycená na kolonkách byla eluována 60 µl destilované vody bez nukleas. Mikrozkušavky s kolonkami byly centrifugovány při 16 000x g po dobu 30 s. Ze získaného roztoku eluované RNA byl odebrán alikvot na stanovení čistoty a koncentrace RNA a pro agarosovou elektroforézu. Ostatní alikvoty byly uchovány při -80 °C.

4.11 RNA agarosová elektroforéza

Použité roztoky

Pufr 5x TBE: 445 mmol/l Tris, 445 mmol/l kyselina boritá, 10 mmol/l EDTA, pH 8

Pro ověření kvality izolované RNA byla využita horizontální elektroforéza na agarosovém gelu s následnou vizualizací nukleových kyselin pomocí interkalačního barviva SYBR™ Green II.

Erlenmayerova baňka a odměrné válce byly předem omyty 10% peroxidem vodíku, zabaleny do alobalu a vloženy do sušárny o teplotě 180 °C na 6 hodin. Separace izolované RNA byla prováděna v 1% (w/v) agarosovém gelu, připraveném ze 400 mg agarosy a 40 ml 0,5x koncentrovaného TBE pufru. Baňka s roztokem agarosy byla umístěna do mikrovlnné trouby a zahřívána, dokud nebyla agarosa zcela rozpuštěna. Poté byl roztok ochlazen pod

proudem tekoucí vody a vlit do připravené formy na gel. Následně byly vloženy hřebeny pro vytvoření jamek a gel byl ponechán 30 minut stát do ztuhnutí za laboratorní teploty.

Mezitím byly připraveny vzorky pro elektroforézu. 10 µl roztoku izolované RNA bylo smícháno se 2 µl 6x koncentrovaného vzorkového pufru Loading Dye. Marker (ssRNA Ladder) byl připraven dle protokolu výrobce (2 µl markeru smícháno s 8 µl 2x koncentrovaného pufru Loading Dye a následně byl zahříván v termobloku při teplotě 90 °C po dobu 2 minut).

Po ztuhnutí gelu byly vyjmuty hřebeny, gel byl umístěn do horizontální elektroforetické soupravy a byl zalit 280 ml 0,5x koncentrovaného TBE pufru. Do jednotlivých jamek byl následně pipetován celý objem připravených vzorků a markeru. Elektroforéza probíhala 40 minut při napětí 110 V.

Následně byl gel vložen do roztoku barvy SYBRTM Green II, který byl připraven smícháním 5 µl SYBRTM Green II s 50 ml 1x koncentrovaného TBE pufru, a inkubován na třepačce po dobu 30 minut. Vizualizace gelu probíhala v temné komoře za použití transiluminátoru Dark reader.

4.12 Stanovení koncentrace a čistoty RNA

Pro stanovení koncentrace a čistoty RNA byla využita UV spektroskopie. Vzorky byly měřeny na spektrofotometru DS-11 (DeNovix) proti ultračisté vodě. Absorbance byla měřena při vlnových délkách 260 nm, která odpovídá absorpčnímu maximu nukleových kyselin, 230 nm a 280 nm, při které nejvíce absorbují proteiny díky přítomnosti aromatických aminokyselin, a 320 nm, která sloužila jako pozadí.

Koncentrace i čistota byly vyhodnoceny přímo programem ve spektrofotometru DS-11 (DeNovix). Pro výpočet čistoty RNA se využívá následující vzorec [102]:

$$\text{čistota} = \frac{A_{260} - A_{320}}{A_{230 \text{ nebo } 280} - A_{320}}$$

Poměr absorbancí při 260 a 280 nm se pro čistou RNA pohybuje okolo hodnoty 2,0. Nižší hodnota tohoto poměru může značit kontaminaci proteiny či jinými látkami absorbující při vlnové délce 280 nm. Druhým parametrem čistoty RNA je poměr absorbancí při 260 a 230 nm, který bývá vyšší než poměr absorbancí 260/280 nm a měl by se pohybovat v rozmezí hodnot 2,0-2,2. Nižší hodnota může indikovat přítomnost kontaminantů absorbujících při vlnové délce 230 nm, jako je například fenol, který obsahuje použité komerční činidlo GENEzol [103,104].

4.13 Reverzní transkripce – syntéza cDNA

Reverzní transkripce (RT) je metoda používaná pro přepis izolované RNA do komplementární DNA (cDNA, z angl. complementary DNA). Izolovaná RNA tedy slouží jako templát, na který nasedají buď náhodné primery, nebo oligo(dT) řetězec. Pomocí enzymu reverzní transkriptasy se následně syntetizuje řetězec DNA [105].

Tato metoda, stejně jako izolace RNA, vyžaduje dodržování zásad sterilní práce a použití sterilního materiálu bez nukleas. Veškerá práce byla tedy prováděna v laminárním boxu. Reverzní transkripce byla provedena za použití komerčního kitu Hight Capacity cDNA Reverse Transcription Kits od Applied Biosystems [106].

Před zahájením práce byl laminární box vytřen 70% ethanolem. Pipety, stojánky na mikrozkušavky a minicentrifuga byly také ořeny 70% ethanolem a vloženy do laminárního boxu, který byl následně vysvícen UV světlem po dobu 15 minut. Zároveň byly používány sterilní "RNase free" špičky s filtry a sterilní plastové mikrozkušavky. Následně byla pro všechny vzorky připravena reakční směs, která pro jeden vzorek obsahovala:

- 4,2 µl "RNase free" voda
- 2 µl 10x RT pufr
- 2 µl 10x RT Random Primers
- 0,8 µl 25x dNTP Mix (100 mmol/l)
- 1 µl RNase inhibitor

Vzorky s izolovanou RNA byly rozmrazeny, promíchány poklepem a zcentrifugovány. Množství 1 µg izolované RNA bylo naředěno "RNase free" vodou na celkový objem 10 µl. K takto připraveným vzorkům bylo pipetováno 10 µl reakční směsi. Následně byly z každého vzorku odebrány 2 µl, které byly využity jako negativní kontrola bez reverzní transkriptasy. Ke zbylým 18 µl směsi byl přidán 1 µl roztoku reverzní transkriptasy (MultiScribe, 50 U/µl). Všechny vzorky byly umístěny do termocykleru Techgene, na kterém byl nastaven program pro reverzní transkripci (viz tabulka 2).

Tabulka 2: Reakční nastavení termocykleru pro reverzní transkripci

| | | |
|---------|-----------------------------------|-------|
| 10 min | nasednutí náhodných primerů | 25 °C |
| 120 min | prodlužování řetězce cDNA | 37 °C |
| 5 min | inaktivace reverzní transkriptasy | 85 °C |
| | ochlazení | 4 °C |

4.14 Kvantitativní PCR

Kvantitativní PCR (qPCR, z angl. quantitative polymerase chain reaction) je velmi citlivá analytická metoda využívaná mimo jiné pro analýzu genové exprese.

Pro qPCR byl použit komerční kit FastStart Essential DNA Probes Master od firmy Roche [107]. Vzorky přepsané cDNA a negativních kontrol byly 10x naředěny "RNase free" vodou. Následně byl pro všechny vzorky připraven "premix", přičemž pro jeden vzorek "premix" obsahoval:

10 μ l FastStart Essential DNA Probes Master (Master Mix)

1 μ l IDT Gene Expression Assay (primery s fluorescenčně značenou sondou pro konkrétní gen)

4 μ l Fast Start Essentials DNA Probes Master H₂O ("PCR grade")

15 μ l premixu bylo pipetováno do jamek mikrotitrační destičky, k němu bylo přidáno 5 μ l 10x ředěné cDNA a jako slepý vzorek byla místo cDNA použita "RNase free" voda. Pro každý vzorek cDNA byly připraveny dvě paralelní stanovení, pro negativní kontroly bez reverzní transkriptasy pouze jedno stanovení. Destička byla přelepena folií a stočena na centrifuze při 300x g po dobu 30 s (Centrifuge 5430, Eppendorf). Následně byla destička umístěna do termocycleru Real-Time System CFX Connect (Bio-Rad) a v programu CFX Maestro byly nastaveny reakční podmínky (tabulka 3).

Tabulka 3: Reakční nastavení termocykleru pro kvantitativní PCR

| | | | |
|--------|--|-------|----------|
| 10 min | aktivace DNA polymerasy | 95 °C | 50 cyklů |
| 15 s | denaturace řetězce DNA | 95 °C | |
| 30 s | nasednutí primerů a sondy a syntéza řetězce cDNA | 60 °C | |

Vyhodnocení relativní genové exprese bylo provedeno přímo programem CFX Maestro včetně statistiky provedené ANOVA testem.

5 VÝSLEDKY

Tato diplomová práce byla vypracována jako součást grantem podpořeného projektu „Komplexní pohled na mechanismus působení a metabolismus inhibitorů tyrosinkinas a studium přístupů k potenciaci jejich protinádorové účinnosti“ (GAČR:18-10251S). Cílem práce bylo charakterizovat vliv inhibitorů tyrosinkinas vandetanibu a lenvatinibu a jejich společného působení s cytotoxickým alkaloidem ellipticinem na vybrané biotransformační enzymy. Zkoumány byly případné změny genové exprese, proteinové exprese a aktivity cytochromů P450 1A1, 1A2 a 1B1, které velmi významně participují na biotransformaci xenobiotik a zároveň jsou studovány v souvislosti s procesem kancerogeneze, a flavinových monooxygenas FMO1 a FMO3, které se podílejí na metabolismu vandetanibu, v ledvinách a játrech z potkanů vystavených zkoumaným látkám. Práce tak navazuje na diplomovou práci Mgr. Sandry Jelínkové, v rámci které zkoumala vliv vandetanibu, lenvatinibu a ellipticinu na expresi a aktivitu potkaních cytochromů P450 1A a 3A v jaterních tkáních [84].

Výchozím materiálem pro experimenty byly tkáně získané z laboratorních potkanů kmene Wistar po jednorázovém podání inhibitorů tyrosinkinas lenvatinibu, vandetanibu, alkaloidu ellipticinu či jejich kombinací (viz kapitola 4.1, strana 35).

5.1 Charakterizace izolovaných mikrosomů

Nejprve byl ze tkání potkanů kontrolních a premedikovaných zkoumanými látkami izolován potřebný biologický materiál. V rámci této diplomové práce byly z ledvin potkanů izolovány mikrosomy (viz kapitola 4.2, strana 36) ke zkoumání proteinové exprese a aktivity vybraných enzymů. Některé experimenty byly prováděny také s jaterními mikrosomy, které byly izolovány a charakterizovány kolegyní Jelínkovou v rámci její diplomové práce [84].

V mikrosomálních frakcích získaných izolací z ledvin laboratorních potkanů kontrolních a premedikovaných inhibitory tyrosinkinas, ellipticinem a jejich kombinacemi byla spektrofotometricky stanovena koncentrace proteinů za využití bicinchoninové kyseliny. Mikrosomy byly dále charakterizovány z hlediska obsahu cytochromu P450, který byl stanoven metodou diferenčních spekter s využitím faktu, že CYP v redukovaném stavu vykazuje v komplexu s CO výrazné absorpční maximum při vlnové délce 450 nm. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 4 na straně 50.

Tabulka 4: Koncentrace proteinů, koncentrace CYP a specifický obsah CYP v ledvinných mikrosomálních frakcích z potkanů kontrolních (KON) a premedikovaných vandetanibem (VAN), lenvatinibem (LEN), ellipticinem (ELLI) a jejich kombinacemi (V+E, L+E).

| premedikace | $c_{\text{prot.}}$ [mg/ml] | c_{CYP} [$\mu\text{mol/l}$] | specifický obsah CYP [$\text{nmol}_{\text{CYP}}/\text{mg}_{\text{prot.}}$] |
|-------------|----------------------------|--|--|
| KON | 15,8 | 1,6 | 0,099 |
| VAN | 18,2 | 1,5 | 0,084 |
| LEN | 20,1 | 1,2 | 0,060 |
| ELLI | 20,2 | 1,5 | 0,073 |
| V+E | 20,3 | 0,9 | 0,044 |
| L+E | 18,9 | 0,9 | 0,048 |

$c_{\text{prot.}}$...koncentrace proteinů v mikrosomálních frakcích z ledvin

c_{CYP} ...koncentrace aktivní formy cytochromu P450

Při stanovení množství cytochromu P450 v ledvinných mikrosomálních frakcích bylo pozorováno absorpční maximum při vlnové délce 450 nm, což odpovídá absorpčním schopnostem aktivní formy redukovaného CYP v komplexu s CO. Zároveň byla při proměřování spekter detekována také neaktivní forma CYP, a to při vlnové délce 420 nm. Neaktivní forma vzniká strukturní změnou enzymu a výsledkem je posun absorpčního maxima komplexu redukovaného CYP s CO z vlnové délky 450 nm na 420 nm [9].

Hodnoty koncentrace a specifického obsahu CYP nebyly příliš vysoké, nejnižší hodnoty vykazovaly mikrosomální frakce ze skupin premedikovaných kombinací ellipticinu s inhibitory tyrosinkinas.

5.2 Charakterizace izolované RNA

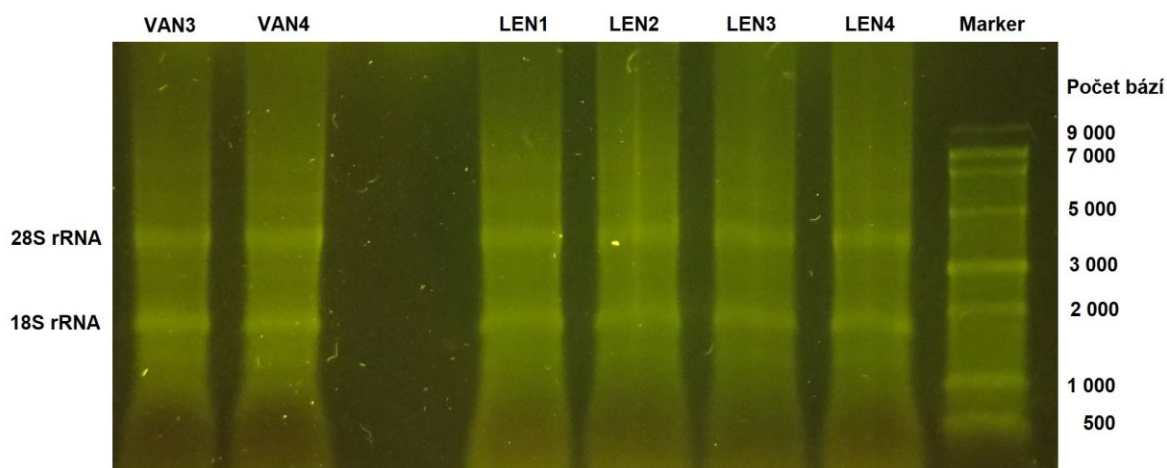
Z ledvin potkanů kontrolních a premedikovaných zkoumanými látkami byla izolována RNA (viz kapitola 4.10, strana 44) pro stanovení relativní genové exprese cílových genů. Nejdříve byla RNA charakterizována z hlediska koncentrace a čistoty (tabulka 5, strana 51). Izolace RNA byla provedena ve čtyřech paralelních vzorcích z každé premedikační skupiny a všechny vzorky byly použity pro další experimenty, neboť se hodnoty poměru absorbancí při vlnových délkách 260 a 280 nm pohybovaly u všech vzorků okolo hodnoty 2,0 a hodnoty poměru absorbancí při vlnových délkách 260 a 230 nm, který indikuje kontaminaci činidlem obsahujícím fenol, se až na výjimky pohybovaly v rozmezí

hodnot 1,8-2,2 [103,104]. Všechny vzorky tedy mohly být považovány za kvalitní z hlediska čistoty.

Tabulka 5: Hodnoty koncentrace a čistoty RNA izolované z mikrosomálních frakcí z ledvin potkanů kontrolní skupiny (KON) a skupin premedikovaných vandetanibem (VAN), lenvatinibem (LEN), ellipticinem (ELLI) a jejich kombinacemi (V+E, L+E).

| premedikace | číslo vzorku | <i>c</i> (μg/μl) | čistota (260/280) | 260/230 |
|-------------|--------------|------------------|-------------------|---------|
| KON | 1 | 0,089 | 1,93 | 1,94 |
| | 2 | 0,182 | 1,94 | 2,00 |
| | 3 | 0,174 | 1,98 | 2,12 |
| | 4 | 0,093 | 2,07 | 1,87 |
| VAN | 1 | 0,102 | 1,98 | 1,99 |
| | 2 | 0,071 | 1,94 | 1,81 |
| | 3 | 0,140 | 1,96 | 1,61 |
| | 4 | 0,185 | 1,96 | 2,05 |
| LEN | 1 | 0,324 | 1,93 | 2,25 |
| | 2 | 0,258 | 1,95 | 2,01 |
| | 3 | 0,138 | 2,00 | 2,03 |
| | 4 | 0,199 | 2,01 | 2,14 |
| ELLI | 1 | 0,124 | 2,05 | 2,11 |
| | 2 | 0,159 | 1,85 | 1,55 |
| | 3 | 0,224 | 1,99 | 2,15 |
| | 4 | 0,224 | 1,91 | 2,19 |
| V+E | 1 | 0,275 | 2,00 | 1,95 |
| | 2 | 0,176 | 1,93 | 1,72 |
| | 3 | 0,091 | 1,99 | 1,68 |
| | 4 | 0,184 | 2,03 | 2,11 |
| L+E | 1 | 0,240 | 1,93 | 2,16 |
| | 2 | 0,119 | 2,02 | 1,70 |
| | 3 | 0,169 | 1,91 | 1,77 |
| | 4 | 0,210 | 1,97 | 2,08 |

Pomocí agarosové elektroforézy bylo prokázáno, že izolovaná RNA je ve všech vzorcích nedegradovaná a dostatečně kvalitní pro další experimenty. Na elektroforetogramu jsou pozorovatelné detekované signály odpovídající 18S a 28S rRNA (obrázek 6).

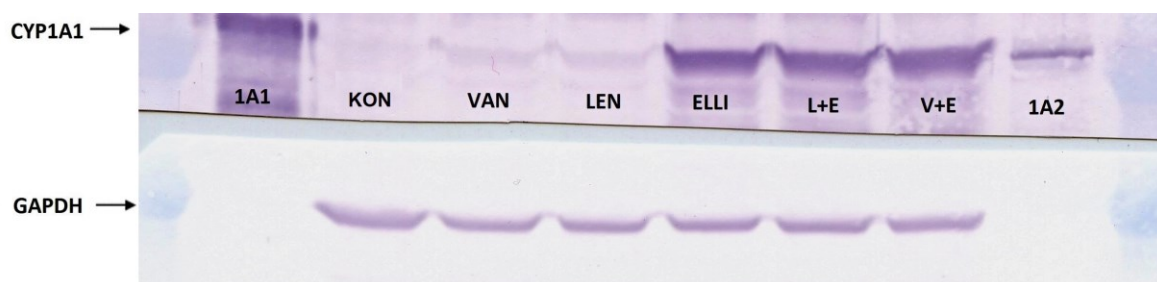


Obrázek 6: Ukázka agarosové elektroforézy. Elektroforetogram z agarosové elektroforézy vzorků RNA izolovaných z ledvin potkanů premedikovaných vandetanibem (VAN) a lenvatinibem (LEN).

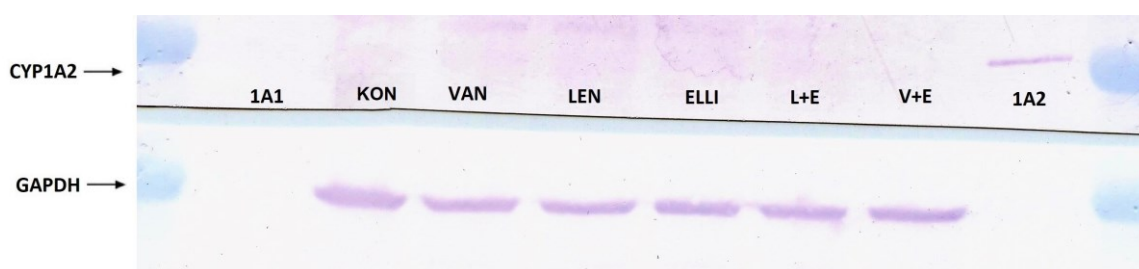
5.3 Vliv vandetanibu, lenvatinibu a ellipticinu na expresi a aktivitu cytochromů P450 podrodiny 1A v ledvinných mikrosomech

Působení vandetanibu, lenvatinibu, ellipticinu a jejich kombinací na cytochromy P450 podrodiny 1A byly v jaterních tkáních zkoumány Mgr. Jelínkovou v rámci její diplomové práce. Bylo zjištěno, že podání ellipticinu a jeho kombinací s inhibitory tyrosinkinas vedlo k nárůstu proteinové i genové exprese obou studovaných izoformem. Stejně tak byl potvrzen indukční vliv ellipticinu na enzymovou aktivitu CYP1A1/1A2, a to jak po samostatném podání, tak v kombinaci s inhibitory tyrosinkinas. Na genové a proteinové úrovni byl také pozorován indukční vliv samostatně podaného vandetanibu i lenvatinibu, avšak pouze na izoformu 1A1 [84].

Proteiny z ledvinných mikrosomálních frakcí byly rozděleny pomocí elektroforézy v SDS-polyakrylamidovém gelu podle molekulových hmotností. Následně byly proteiny přeneseny na PVDF membránu metodou Western blot. Membrána byla rozstříhnutá na dvě části mezi molekulovými hmotnostmi 50 kDa, která obsahovala detekované enzymy, a 37 kDa, kde byla jako kontrola nanášeného množství proteinů detekována glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa (GAPDH), která je v organismu na rozdíl od zkoumaných enzymů exprimována konstitutivně. Na obrázcích 7 a 8 jsou zobrazeny ukázky PVDF membrán s detekovanými izoformami CYP1A1 a CYP1A2.



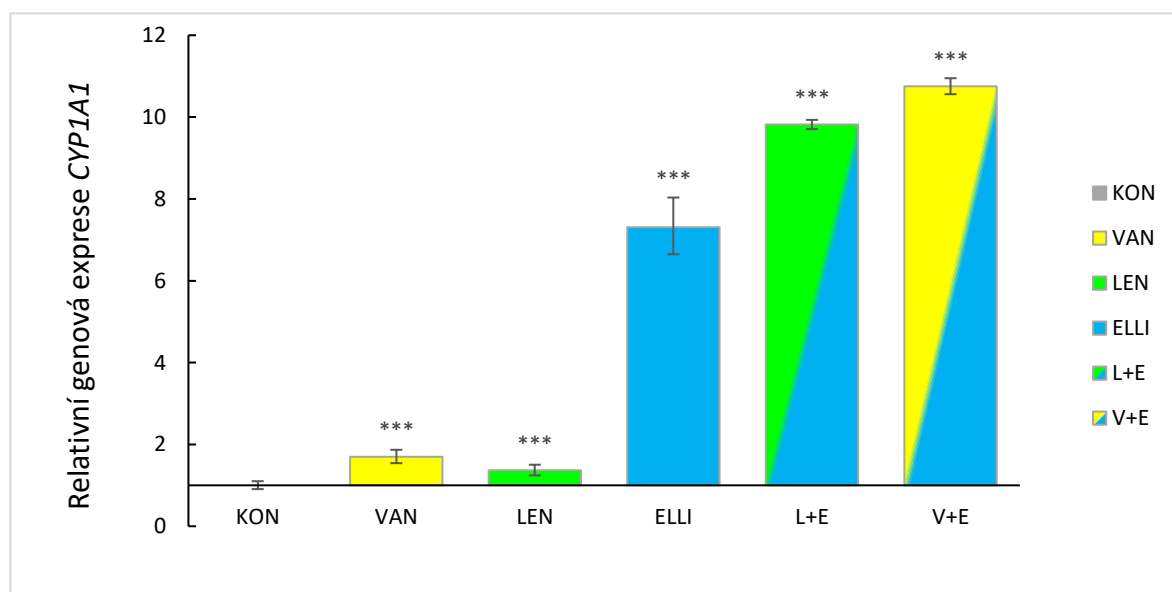
Obrázek 7: Imunodetekce CYP1A1 a CYP1A2 v ledvinných mikrosomech. Ukázka vyvolané membrány po elektropřenosu proteinů metodou Western blot a následné imunodetekci protilátkou proti CYP1A1 v ledvinných mikrosomálních frakcích z potkanů kontrolních (KON) a premedikovaných vandetanibem (VAN), lenvatinibem (LEN), ellipticinem (ELLI) a jejich kombinacemi (L+E, V+E). V drahách označených 1A1 a 1A2 byly detekovány standardy rekombinantních potkaních CYP1A1/1A2 v SupersomechTM.



Obrázek 8: Imunodetekce CYP1A2 v ledvinných mikrosomech. Ukázka vyvolané membrány po elektropřenosu proteinů metodou Western blot a následné imunodetekci CYP1A2 v ledvinných mikrosomálních frakcích z potkanů kontrolních (KON) a premedikovaných vandetanibem (VAN), lenvatinibem (LEN), ellipticinem (ELLI) a jejich kombinacemi (L+E, V+E). V drahách označených 1A1 a 1A2 byly detekovány standardy rekombinantních potkaních CYP1A1/1A2 v SupersomechTM.

Proteinová exprese CYP1A1 byla výrazně zvýšena v ledvinách potkanů premedikovaných ellipticinem a jeho kombinacemi s vandetanibem či lenvatinibem, jak je zřejmé z obrázku 7 (strana 53). Dále je pozorovatelné zvýšení exprese izoformy 1A1 i po samostatném podání jednotlivých inhibitorů tyrosinkinas oproti kontrolní skupině, kde byl detekován velmi slabý proužek odpovídající CYP1A1. Tyto výsledky odpovídají výsledkům kolegyně Jelínkové, která provedla obdobné stanovení v jaterních mikrosomech [84]. Přítomnost cytochromu P450 1A2 nebyla v ledvinných mikrosomech pomocí imunodetekce prokázána (obrázek 8, strana 53).

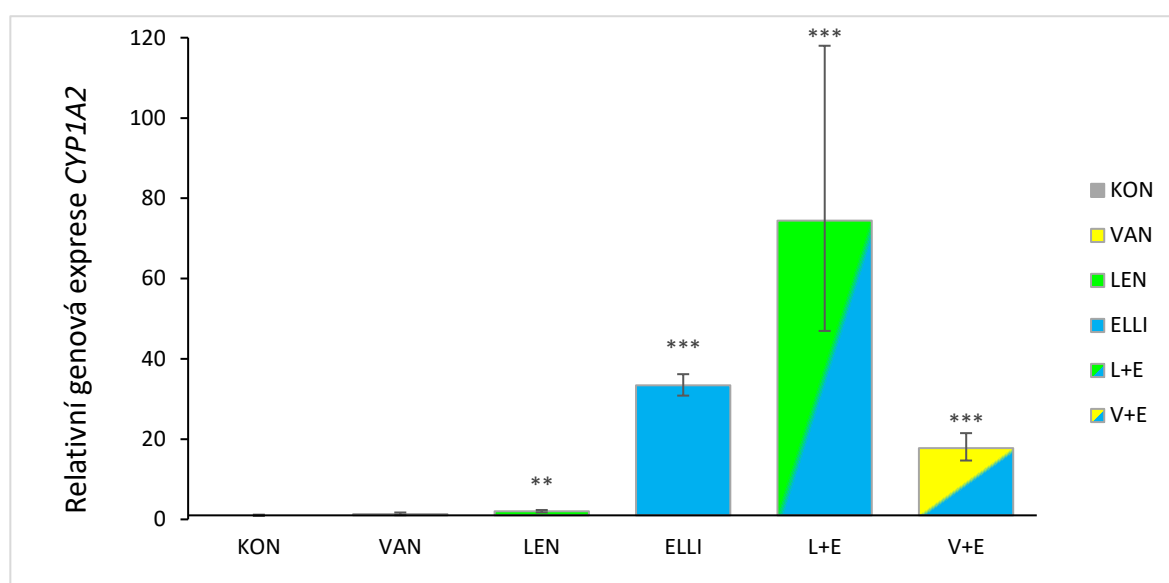
Pro sledování vlivu inhibitorů tyrosinkinas a ellipticinu na genovou expresi *CYP1A1/1A2* byla využita metoda kvantitativní PCR. Templátem reakce byla cDNA připravená pomocí reverzní transkripce RNA izolované z ledvin potkanů kontrolních a premedikovaných vandetanibem, lenvatinibem, ellipticinem a jejich kombinacemi. Jako referenční geny, které by měly být ve všech buňkách exprimovány konstitutivně, byly využity *β-aktin* a *Hprt1*. Získaná data byla vyhodnocena programem CFX Maestro (Bio-Rad) a výsledky jsou graficky znázorněny na obrázcích 9 a 10.



Obrázek 9: Relativní genová exprese *CYP1A1* v ledvinách potkanů premedikovaných vandetanibem (VAN), lenvatinibem (LEN), ellipticinem (ELLI) a jejich kombinacemi (L+E, V+E) v porovnání s kontrolní skupinou (KON). Získaná data a směrodatná odchylka měření byly vyhodnoceny programem CFX Maestro, statistická významnost pomocí ANOVA testu. * $p < 0,001$ ($n = 4$).**

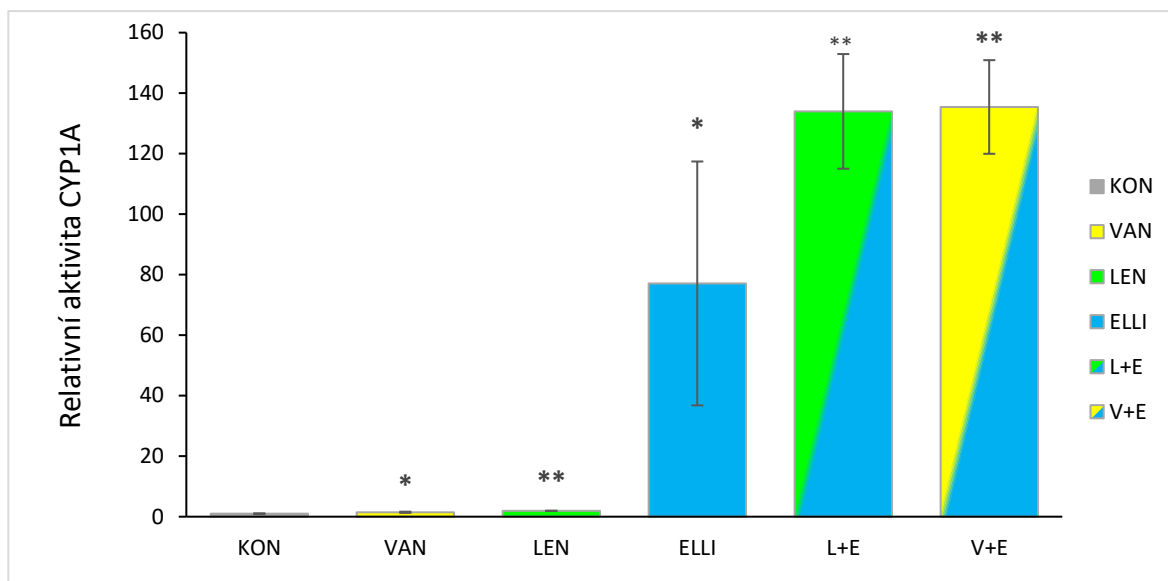
Z obrázku 9 (strana 54) je patrné, že došlo k signifikantnímu zvýšení genové exprese *CYP1A1* v ledvinných mikrosomálních frakcích po vystavení potkanů všem zkoumaným látkám i jejich kombinacím. Nejvyšší indukční vliv na genovou expresi *CYP1A1* vykazoval samostatně podaný ellipticin a v ještě větší míře i jeho kombinace s inhibitory tyrosinkinas.

V případě *CYP1A2* byl pozorován nárůst genové exprese po premedikaci všemi zkoumanými látkami kromě samostatně podaného vandetanibu. Nejvyšší indukce byla zjištěna v ledvinách potkanů premedikovaných kombinací ellipticinu a lenvatinibu (obrázek 10).



Obrázek 10: Relativní genová exprese *CYP1A2* v ledvinách potkanů premedikovaných vandetanibem (VAN), lenvatinibem (LEN), ellipticinem (ELLI) a jejich kombinacemi (L+E, V+E) v porovnání s kontrolní skupinou (KON). Získaná data a směrodatná odchylka měření byly vyhodnoceny programem CFX Maestro, statistická významnost pomocí ANOVA testu. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ ($n = 4$).

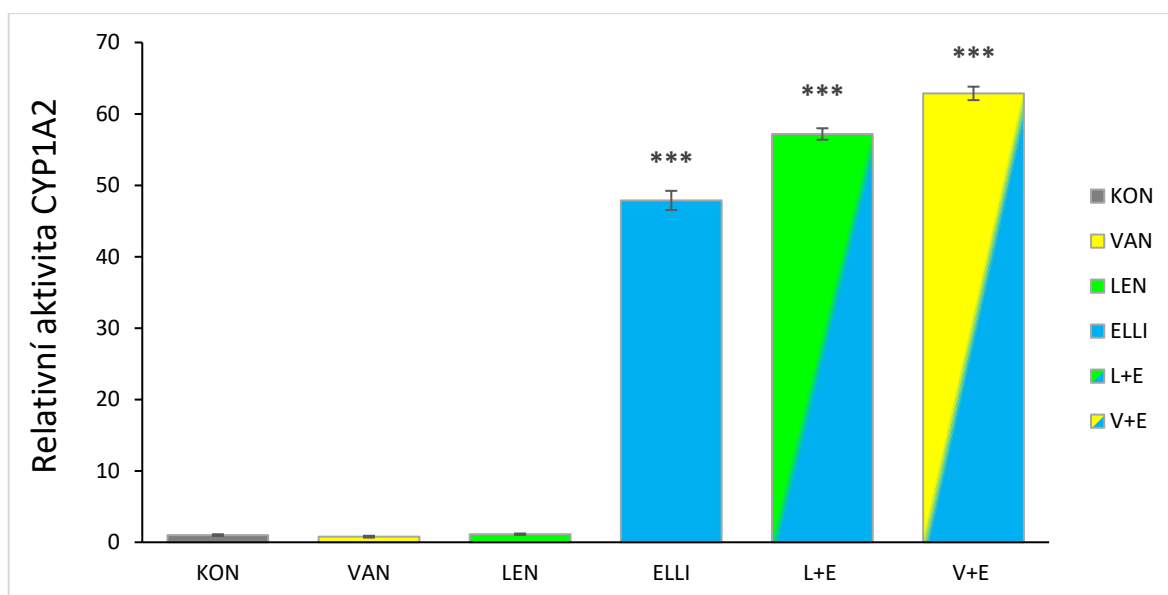
Dalším sledovaným parametrem v ledvinných mikrosomálních frakcích byla aktivita cytochromů P450 podrodiny 1A (obrázek 11, strana 56), konkrétně CYP1A1 a CYP1A2, k jejímuž stanovení byla využita markerová reakce *O*-deethylace 7-ethoxyresorufinu na fluorescenční produkt resorufin [93].



Obrázek 11: Enzymová aktivita CYP1A v ledvinných mikrosomech potkanů kontrolních (KON) a premedikovaných vandetanibem (VAN), lenvatinibem (LEN), ellipticinem (ELLI) a jejich kombinacemi (L+E, V+E) měřená metodou EROD. Enzymová aktivita ($\text{pmol}_{\text{resorufin}}/\text{min}/\text{pmol}_{\text{CYP}}$) byla vztažena ke kontrolnímu vzorku. Statistická významnost byla vyhodnocena ze 4 měření pomocí T-testu. ** $p < 0,01$ a * $p < 0,05$.

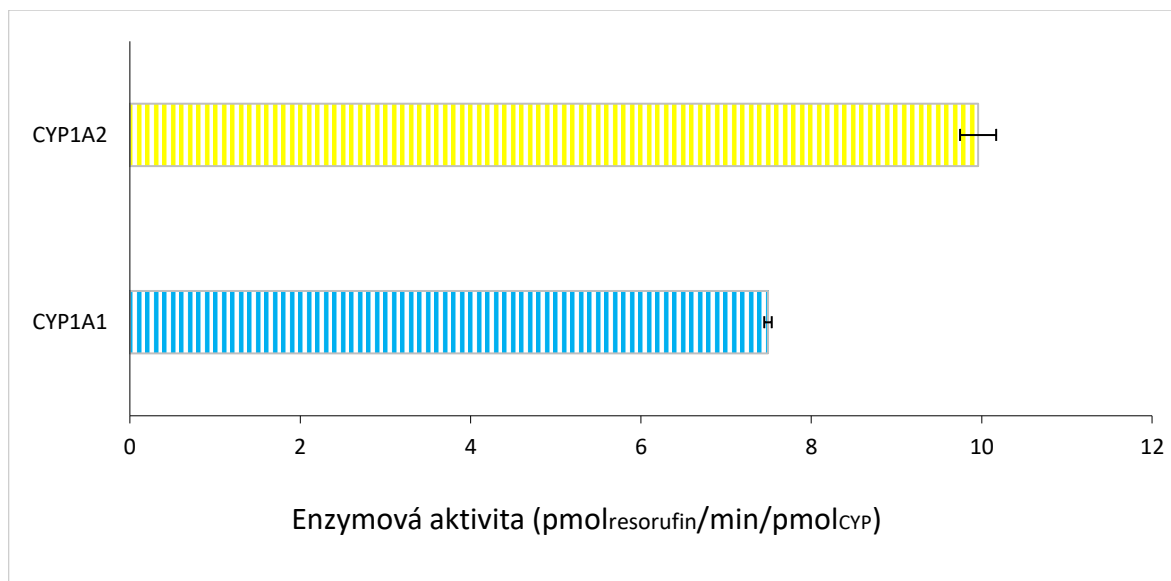
Jak u premedikace samotným ellipticinem, tak po aplikaci kombinací ellipticinu s inhibitory tyrosinkinás došlo k výraznému zvýšení aktivity CYP1A v ledvinných mikrosomech potkanů. Ve srovnání s kontrolní skupinou je patrný nárůst aktivity také po podání samotného vandetanibu a lenvatinibu.

Přestože přítomnost CYP1A2 nebyla v ledvinných mikrosomech pomocí imunodetekce prokázána, bylo provedeno stanovení aktivity této izoformy pomocí markerové reakce O-demethylace 7-methoxyresorufinu (obrázek 12, strana 57). Tato reakce by měla být vysoce specifická pro izoformu 1A2 [94].



Obrázek 12: Rychlost *O*-demethylace 7-methoxyresorufinu zprostředkovaná ledvinnými mikrosomy potkanů kontrolních (KON) a premedikovaných vandetanibem (VAN), lenvatinibem (LEN), ellipticinem (ELLI) a jejich kombinacemi (L+E, V+E) měřená metodou MROD. Enzymová aktivita ($\text{pmol}_{\text{resorufin}}/\text{min}/\text{pmol}_{\text{CYP}}$) byla vztažena ke kontrolnímu vzorku. Statistická významnost byla vyhodnocena ze 3 měření pomocí T-testu. *** $p < 0,001$.

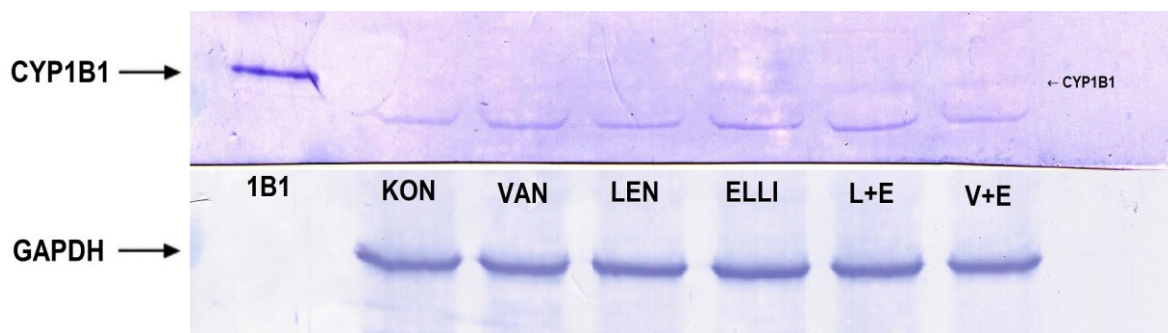
V ledvinných mikrosomech potkanů premedikovaných ellipticinem a v ještě větší míře po aplikaci jeho kombinací s inhibitory tyrosinkinas došlo k výraznému zvýšení rychlosti přeměny 7-methoxyresorufinu na resorufin, jak je patrné z obrázku 12. Jelikož však nebyla tato izoforma v ledvinných mikrosomech detekována pomocí imunodetekce, byl tento výsledek překvapivý. Aby byla ověřena specifická reakce pro izoformu 1A2, bylo provedeno stanovení aktivity metodou MROD za použití rekombinantních potkaních CYP1A1 a CYP1A2 v SupersomechTM (obrázek 13, strana 58). Ukázalo se, že potkaní CYP1A1 katalyzuje *O*-demethylaci 7-methoxyresorufinu jen o málo účinněji než CYP1A2, a není tedy možné tuto metodu považovat za specifickou pro izoformu 1A2.



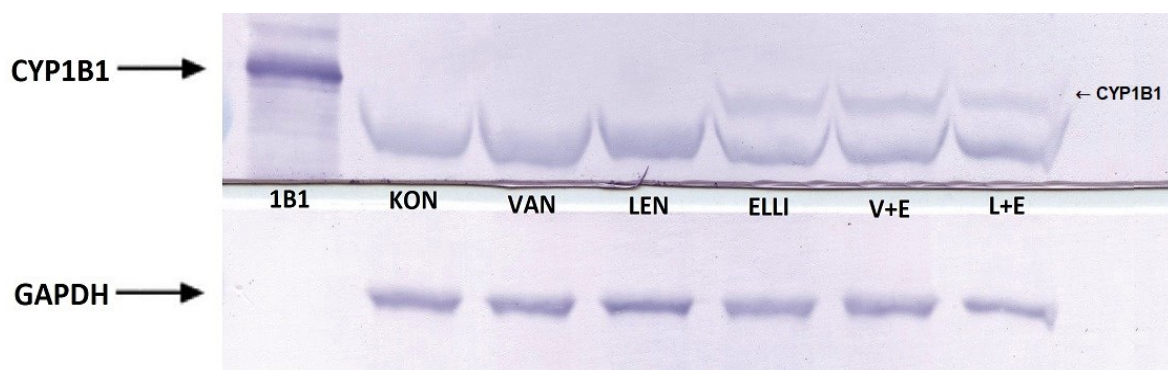
Obrázek 13: Rychlost *O*-demethylace 7-methoxyresorufinu katalyzované rekombinantními potkaními CYP1A1 a CYP1A2 v SupersomechTM.

5.4 Vliv vandetanibu, lenvatinibu a ellipticinu na expresi cytochromu P450 1B1 v ledvinných a jaterních mikrosomech

Dalším studovaným cytochromem P450 byla izoforma 1B1, která byla zkoumána jak v ledvinných, tak v jaterních mikrosomálních frakcích. Na obrázcích 14 a 15 (strana 59) jsou zobrazeny ukázky PVDF membrán s detekovanou izoformou 1B1 v ledvinných a jaterních mikrosomálních frakcích z potkanů kontrolních a premedikovaných vandetanibem, lenvatinibem, ellipticinem a jejich kombinacemi.



Obrázek 14: Imunodetekce CYP1B1 v ledvinných mikrosomech. Ukázka vyvolané membrány po elektropřenosu proteinů metodou Western blot a následné imunodetekci CYP1B1 v ledvinných mikrosomálních frakcích z potkanů kontrolních (KON) a premedikovaných vandetanibem (VAN), lenvatinibem (LEN), ellipticinem (ELLI) a jejich kombinacemi (L+E, V+E). V dráze označené 1B1 byl detekován standard rekombinantního potkaního CYP1B1 v SupersomechTM.

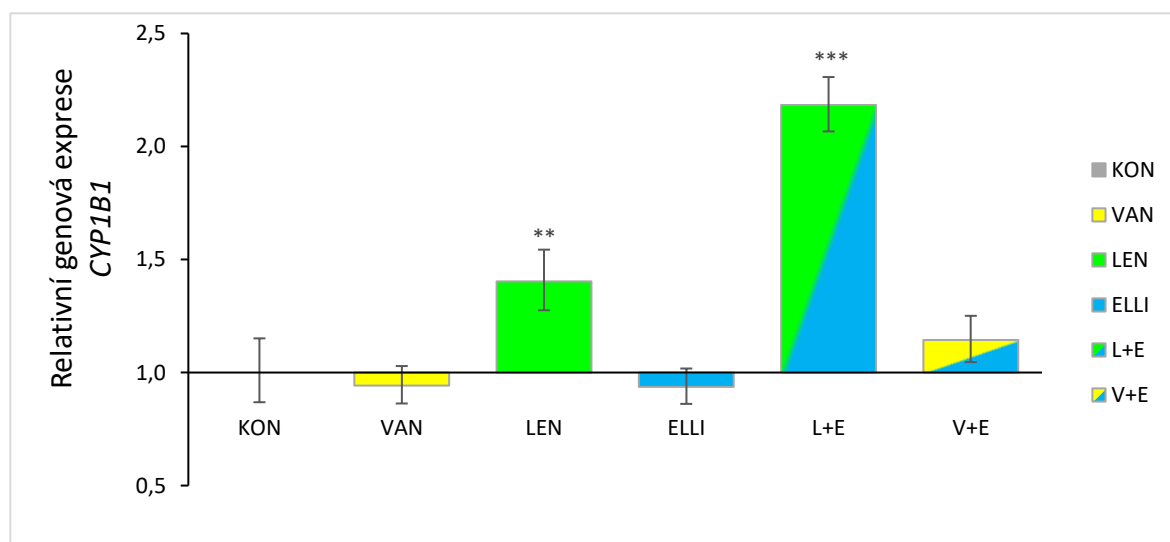


Obrázek 15: Imunodetekce CYP1B1 v jaterních mikrosomech. Ukázka vyvolané membrány po elektropřenosu proteinů metodou Western blot a následné imunodetekci CYP1B1 v jaterních mikrosomálních frakcích z potkanů kontrolních (KON) a premedikovaných vandetanibem (VAN), lenvatinibem (LEN), ellipticinem (ELLI) a jejich kombinacemi (L+E, V+E). V dráze označené 1B1 byl detekován standard rekombinantního potkaního CYP1B1 v SupersomechTM.

Přítomnost izoformy 1B1 byla v ledvinných mikrosomech prokázána pomocí imunodetekce ve vzorcích potkanů premedikovaných ellipticinem a jeho kombinacemi s inhibitory tyrosinkinas. Lehký nárůst proteinové exprese byl oproti kontrolnímu vzorku, ve kterém nebyl CYP1B1 detekován vůbec, zaznamenán také ve vzorcích potkanů vystavených působení vandetanibu a lenvatinibu, avšak proužky detekovaného proteinu byly velmi slabé (obrázek 14). V jaterních vzorcích byla tato izoforma detekována pouze v mikrosomálních frakcích z potkanů vystavených ellipticinu a jeho kombinacím s inhibitory tyrosinkinas. Velký indukční vliv na proteinovou expresi CYP1B1 vykazoval

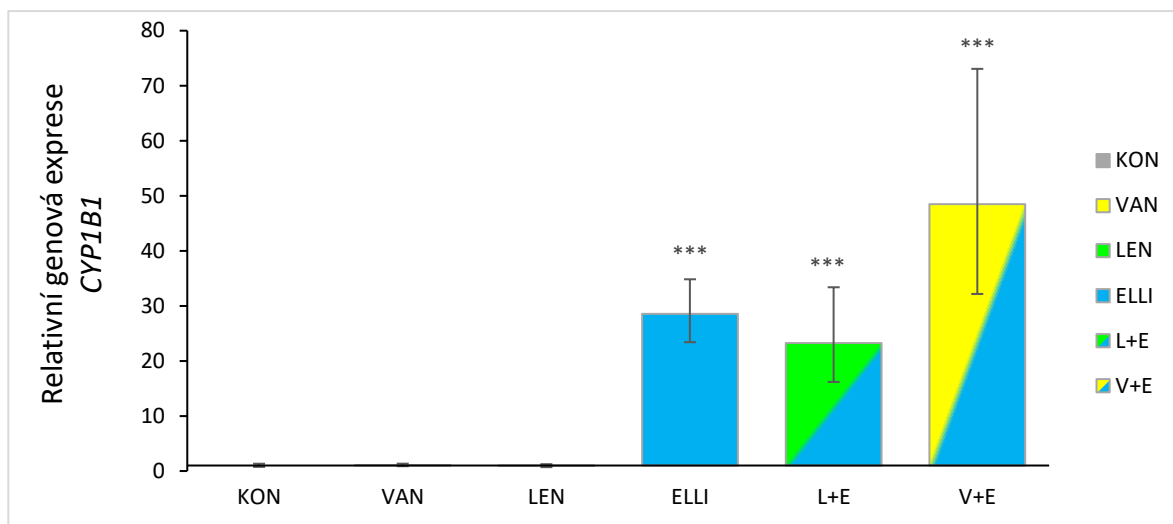
ellipticin jak samotný, tak v kombinaci s vandetanibem. Nicméně indukční potenciál kombinovaného podání ellipticinu a lenvatinibu byl pravděpodobně podobný, přestože v mikrosomech potkanů, kterým byl podán ellipticin v kombinaci s lenvatinibem, byl detekován slabší proužek odpovídající CYP1B1, neboť i proužek odpovídající GAPDH byl v dráze pro tento vzorek slabší (obrázek 15, strana 59).

Pro analýzu genové exprese *CYP1B1* pomocí kvantitativní PCR byla použita cDNA připravená pomocí reverzní transkripce RNA izolované z ledvin a jater potkanů kontrolních a premedikovaných vandetanibem, lenvatinibem, ellipticinem a jejich kombinacemi. Jako referenční geny, které by měly být ve všech buňkách exprimovány konstitutivně, byly využity pro ledvinné vzorky β -aktin a *Hprt1*, pro jaterní vzorky navíc ještě *GAPDH*. Získaná data byla vyhodnocena programem CFX Maestro (Bio-Rad) a výsledky jsou graficky znázorněny na obrázcích 16 a 17.



Obrázek 16: Relativní genová exprese *CYP1B1* v ledvinách potkanů premedikovaných vandetanibem (VAN), lenvatinibem (LEN), ellipticinem (ELLI) a jejich kombinacemi (L+E, V+E) v porovnání s kontrolními vzorky (KON). Získaná data a směrodatná odchylka měření byly vyhodnoceny programem CFX Maestro, statistická významnost pomocí ANOVA testu. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ ($n = 4$).

Z grafu na obrázku 16 je zřejmé, že k signifikantnímu nárůstu genové exprese *CYP1B1* v ledvinách došlo pouze po premedikaci samotným lenvatinibem, nebo v jeho kombinaci s ellipticinem.



Obrázek 17: Relativní genová exprese CYP1B1 v játrech potkanů premedikovaných vandetanibem (VAN), lenvatinibem (LEN), ellipticinem (ELLI) a jejich kombinacemi (L+E, V+E) ve srovnání s kontrolními vzorky (KON). Získaná data a směrodatná odchylka měření byly vyhodnoceny programem CFX Maestro, statistická významnost pomocí ANOVA testu. *** $p < 0,001$ ($n = 4$).

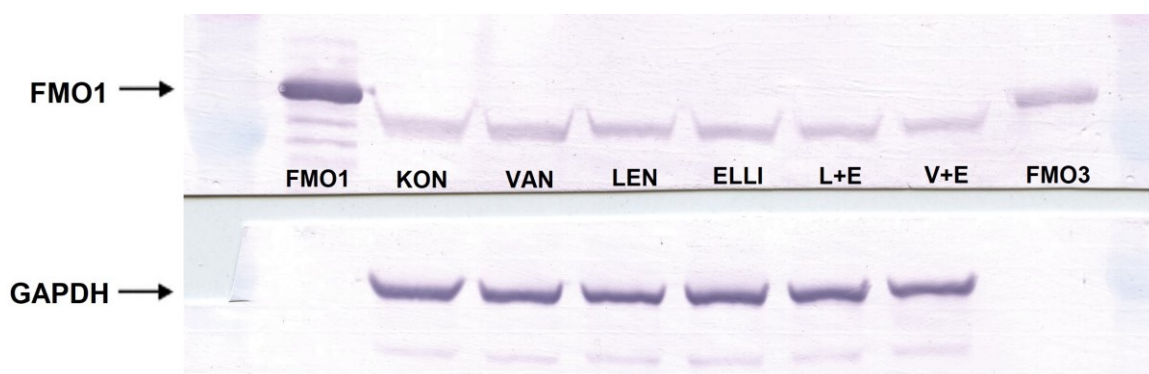
V případě jaterních vzorků byl vliv zkoumaných látek na genovou expresi CYP1B1 odlišný od vzorků ledvinných. Zatímco relativní genová exprese po premedikaci samotnými inhibitory tyrosinkinasy byla srovnatelná s kontrolní skupinou, podání ellipticinu samotného i jeho kombinací s inhibitory tyrosinkinasy velmi výrazně genovou expresi CYP1B1 indukovalo.

Stanovení aktivity izoformy 1B1 nebylo provedeno ani v ledvinných, ani v jaterních vzorcích, neboť nebyla nalezena vhodná markerová reakce, specifická pro tuto izoformu.

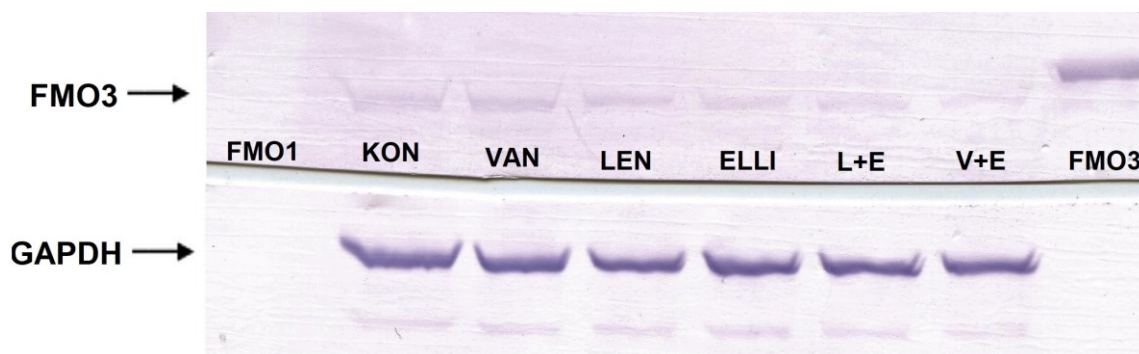
5.5 Vliv vandetanibu, lenvatinibu a ellipticinu na expresi a aktivitu flavinových monooxygenas v ledvinných a jaterních mikrosomech

Posledními studovanými enzymy byly flavinové monooxygenasy, konkrétně izoformy FMO1 a FMO3, které se významně podílejí na metabolismu studované látky – vandetanibu. Obě izoformy byly zkoumány jak v ledvinných, tak v jaterních mikrosomálních frakcích. Na obrázcích 18-21 (strana 62-63) jsou zobrazeny ukázky PVDF

membrán s detekovanými izoformami FMO1 a FMO3 v ledvinných a jaterních mikrosomálních frakcích z potkanů kontrolních a premedikovaných vandetanibem, lenvatinibem, ellipticinem a jejich kombinacemi.



Obrázek 18: Imunodetekce FMO v ledvinných mikrosomech. Ukázka vyvolané membrány po elektropřenosu proteinů metodou Western blot a následné imunodetekci protilátkou proti FMO1 v ledvinných mikrosomálních frakcích z potkanů kontrolních (KON) a premedikovaných vandetanibem (VAN), lenvatinibem (LEN), ellipticinem (ELLI) a jejich kombinacemi (L+E, V+E). V drahách označených FMO1 a FMO3 byly detekovány standardy rekombinantních potkaních FMO1/3 v SupersomechTM.

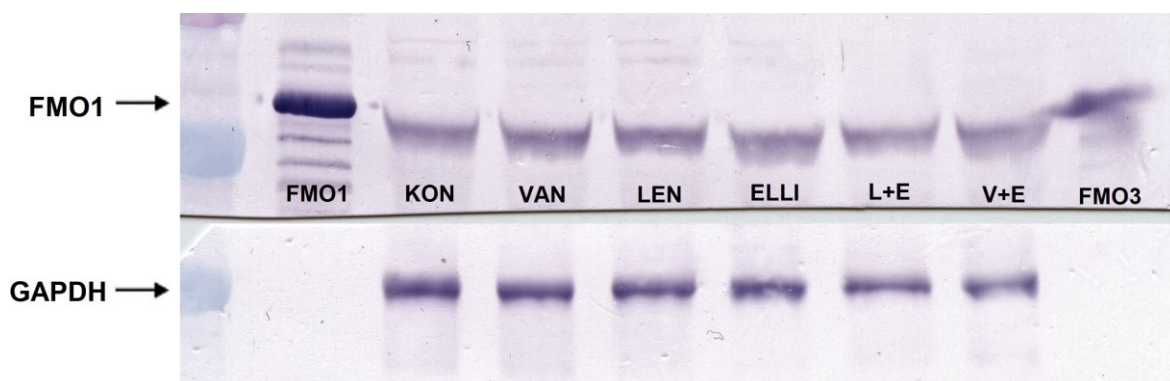


Obrázek 19: Imunodetekce FMO3 v ledvinných mikrosomech. Ukázka vyvolané membrány po elektropřenosu proteinů metodou Western blot a následné imunodetekci FMO3 v ledvinných mikrosomálních frakcích z potkanů kontrolních (KON) a premedikovaných vandetanibem (VAN), lenvatinibem (LEN), ellipticinem (ELLI) a jejich kombinacemi (L+E, V+E). V drahách označených FMO1 a FMO3 byly detekovány standardy rekombinantních potkaních FMO1/3 v SupersomechTM.

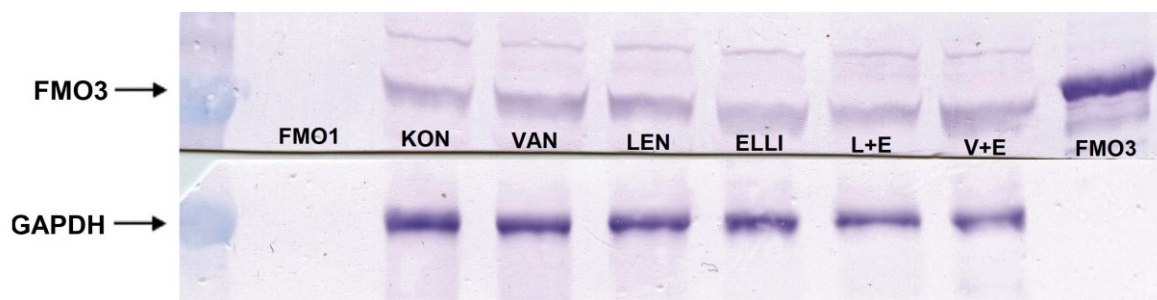
Prvním důležitým poznatkem při imunodetekci FMO1 (obrázek 18) bylo, že primární protilátka anti-FMO1 není specifická vůči izoformě FMO1, neboť byl detekován také proužek standardu rekombinantní potkaní FMO3. Pomocí protilátky anti-FMO1 tedy není možné od sebe zkoumané izoformy odlišit. Vliv zkoumaných látek na izoformu FMO1 proto

bude v následujících odstavcích komentován jako vliv na FMO1/3. Primární protilátka anti-FMO3 se ukázala být specifická pro danou izoformu.

Působením studovaných látek nedošlo k prokazatelné změně proteinové exprese FMO1/3 v ledvinách premedikovaných potkanů oproti kontrolní skupině (obrázek 18, strana 62). V případě FMO3 bylo pozorováno velmi mírné snížení proteinové exprese ve vzorcích po premedikaci kombinacemi ellipticinu s inhibitory tyrosinkinas (obrázek 19, strana 62). Podání samotných inhibitorů tyrosinkinas nemělo žádný prokazatelný vliv na proteinovou expresi FMO1 nebo FMO3.



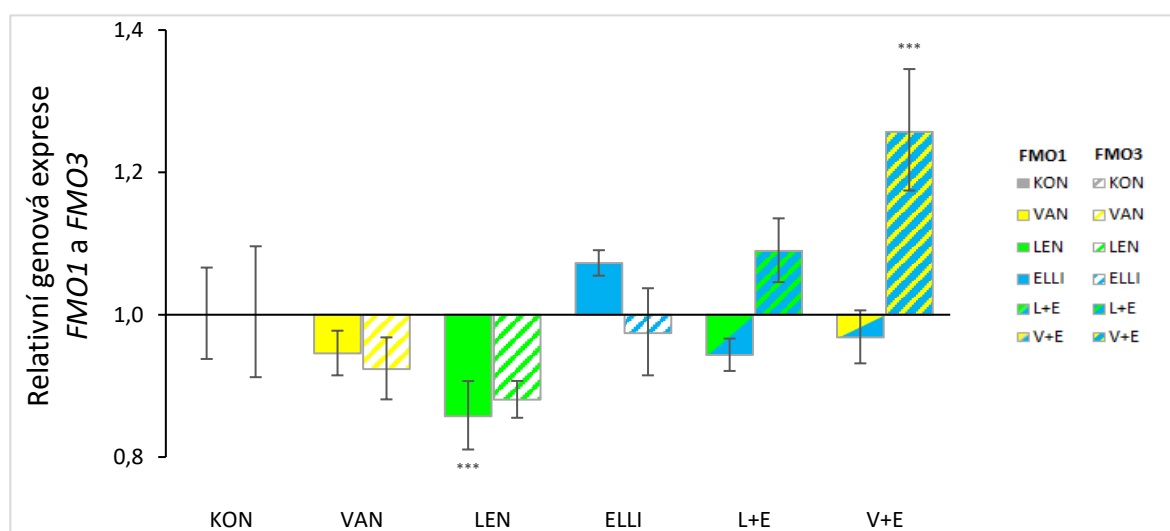
Obrázek 20: Imunodetekce FMO v jaterních mikrosomech. Ukázka vyvolané membrány po elektropřenosu proteinů metodou Western blot a následné imunodetekci protilátkou proti FMO1 v jaterních mikrosomálních frakcích z potkanů kontrolních (KON) a premedikovaných vandetanibem (VAN), lenvatinibem (LEN), ellipticinem (ELLI) a jejich kombinacemi (L+E, V+E). V drahách označených FMO1 a FMO3 byly detekovány standardy rekombinantních potkaních FMO1/3 v SupersomechTM.



Obrázek 21: Imunodetekce FMO3 v jaterních mikrosomech. Ukázka vyvolané membrány po elektropřenosu proteinů metodou Western blot a následné imunodetekci FMO3 v jaterních mikrosomálních frakcích z potkanů kontrolních (KON) a premedikovaných vandetanibem (VAN), lenvatinibem (LEN), ellipticinem (ELLI) a jejich kombinacemi (L+E, V+E). V drahách označených FMO1 a FMO3 byly detekovány standardy rekombinantních potkaních FMO1/3 v SupersomechTM.

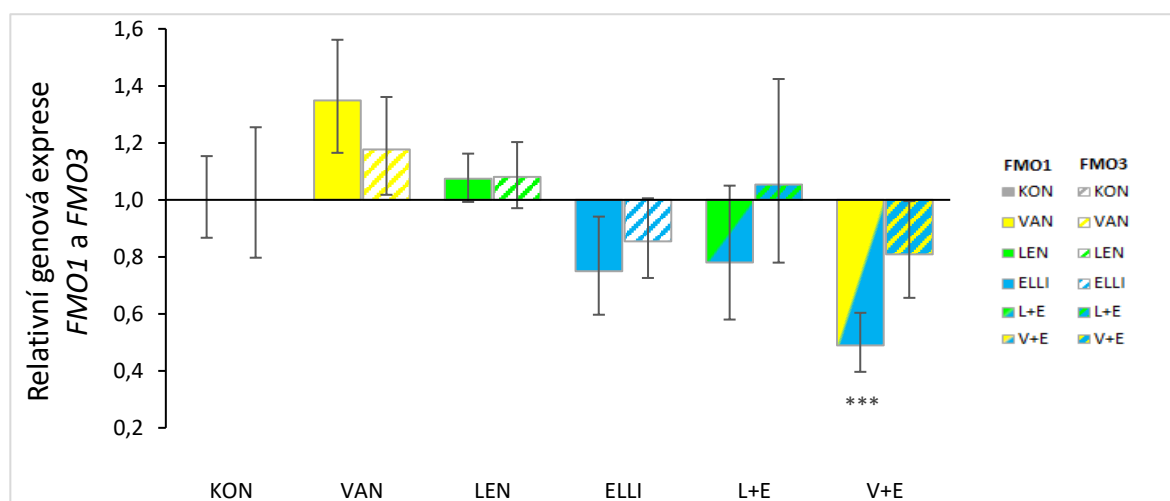
Podobně jako v ledvinných mikrosomech ani v jaterních mikrosomech nedošlo působením studovaných látek k prokazatelné změně proteinové exprese FMO1/3 ve vzorcích z potkanů premedikovaných zkoumanými látkami oproti kontrolní skupině (obrázek 20, strana 63). Ani v případě FMO3 nebyl pozorován prokazatelný vliv studovaných látek na proteinovou expresi, v drahách se vzorky po premedikaci kombinacemi ellipticinu s inhibitory tyrosinkinas byl opět pozorován pouze náznak snížení proteinové exprese (obrázek 21, strana 63). V tomto případě ale mohlo být toto snížení způsobeno nanesením menšího množství proteinu, neboť i proužky odpovídající GAPDH byly v drahách pro vzorky z potkanů premedikovaných ellipticinem v kombinaci s inhibitory tyrosinkinas slabší.

Pro analýzu genové exprese *FMO1* a *FMO3* pomocí kvantitativní PCR byla opět použita cDNA připravená reverzní transkripcí RNA izolované z ledvin a jater potkanů kontrolních a premedikovaných vandetanibem, lenvatinibem, ellipticinem a jejich kombinacemi. Jako referenční geny, které by měly být ve všech buňkách exprimovány konstitutivně, byly využity pro ledvinné vzorky β -aktin a *Hprt1*, pro jaterní vzorky navíc ještě *GAPDH*. Získaná data byla vyhodnocena programem CFX Maestro (Bio-Rad) a výsledky jsou graficky znázorněny na obrázcích 22 a 23.



Obrázek 22: Relativní genová exprese *FMO1* a *FMO3* v ledvinách potkanů premedikovaných vandetanibem (VAN), lenvatinibem (LEN), ellipticinem (ELLI) a jejich kombinacemi (L+E, V+E) v porovnání s kontrolní skupinou (KON). Získaná data a směrodatná odchylka měření byla vyhodnocena programem CFX Maestro, statistická významnost pomocí ANOVA testu. * $p < 0,001$ ($n = 4$).**

Relativní genová exprese *FMO1* v ledvinách byla po premedikaci zkoumanými látkami srovnatelná s kontrolní skupinou. Největší vliv na genovou expresi této izoformy vykázal lenvatinib, který způsobil 15% snížení genové exprese *FMO1*. V případě *FMO3* byla relativní genová exprese také srovnatelná s kontrolní skupinou kromě vzorku po premedikaci ellipticinem v kombinaci s vandetanibem, kde došlo k mírné indukci genové exprese (obrázek 22, strana 64).

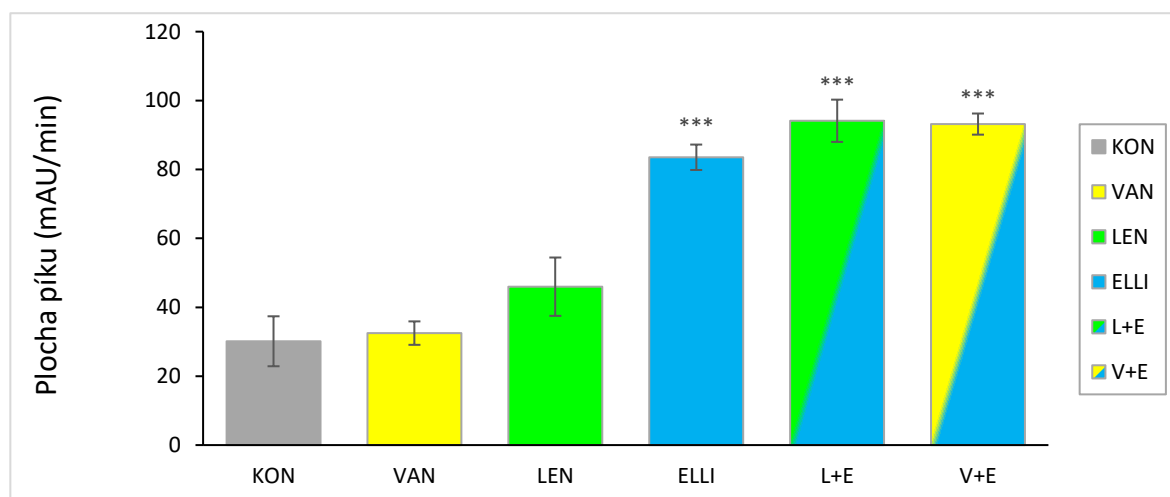


Obrázek 23: Relativní genová exprese *FMO1* a *FMO3* v játrech potkanů premedikovaných vandetanibem (VAN), lenvatinibem (LEN), ellipticinem (ELLI) a jejich kombinacemi (L+E, V+E) v porovnání s kontrolní skupinou (KON). Získaná data a směrodatná odchylka měření byla vyhodnocena programem CFX Maestro, statistická významnost pomocí ANOVA testu. * $p < 0,001$ ($n = 4$).**

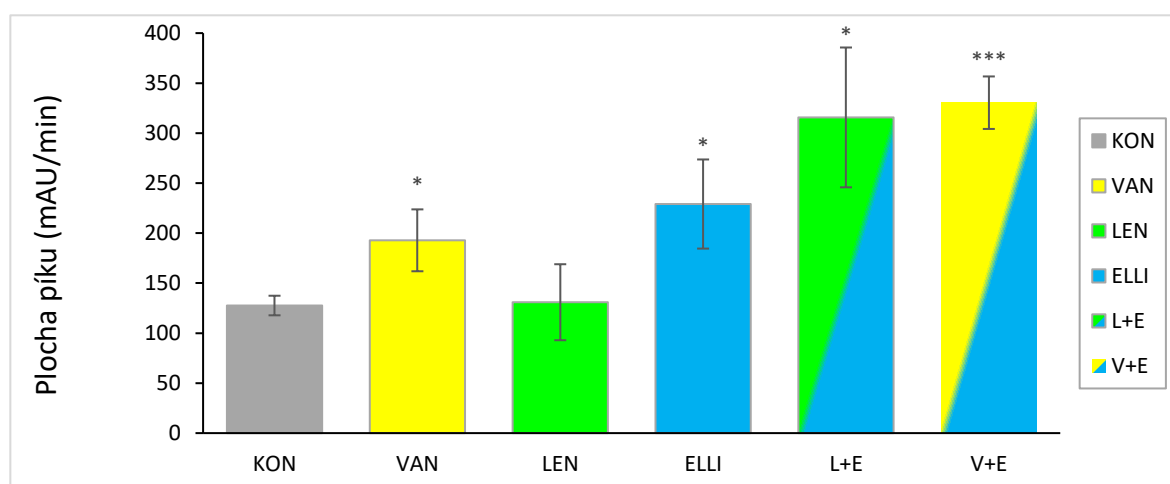
Ani v jaterních vzorcích nebyly zaznamenány výrazné změny v genové expresi flavinových monooxygenas. V případě *FMO1* se objevila tendence ke snížení genové exprese po podání ellipticinu či jeho kombinací s inhibitory tyrosinkinas. Tento pokles byl nejvýraznější ve vzorku ellipticinu v kombinaci s vandetanibem. Působení zkoumaných látek na genovou expresi *FMO3* v jaterních vzorcích vykazovalo podobný trend jako v případě *FMO1*, žádné významné změny v genové expresi nebyly oproti kontrolní skupině pozorovány (obrázek 23).

Pro sledování aktivity FMO v mikrosomálních frakcích ledvin a jater potkanů kontrolních a premedikovaných zkoumanými látkami byla využita oxidace methyl-p-tolyl sulfidu. Pro porovnání enzymové aktivity FMO v jednotlivých mikrosomálních frakcích byla vyhodnocována plocha píku jediného nalezeného metabolitu, který byl detekován na

chromatogramech z reakčních směsí po inkubaci s ledvinnými a jaterními mikrosomy z potkanů kontrolních a premedikovaných zkoumanými látkami a nevyskytoval se ve vzorcích, které byly využity jako "blanky" a neobsahovaly buď NADPH generující systém, nebo mikrosomy (obrázky 24 a 25). Dle literatury by se mělo jednat o methyl-p-tolyl sulfoxid [95–100]. Této látce odpovídalo i absorpční spektrum detekovaného metabolitu [108].



Obrázek 24: Míra oxidace methyl-p-tolyl sulfidu zprostředkované ledvinnými mikrosomy potkanů kontrolních (KON) a premedikovaných vandetanibem (VAN), lenvatinibem (LEN), ellipticinem (ELLI) a jejich kombinacemi (V+E, L+E). Statistická významnost byla vyhodnocena ze 3 měření pomocí T-testu. *** $p < 0,001$.



Obrázek 25: Míra oxidace methyl-p-tolyl sulfidu zprostředkované jaterními mikrosomy potkanů kontrolních (KON) a premedikovaných vandetanibem (VAN), lenvatinibem (LEN), ellipticinem (ELLI) a jejich kombinacemi (V+E, L+E). Statistická významnost byla vyhodnocena ze 3 měření pomocí T-testu. *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$.

Jak u potkanů vystavených samotnému ellipticinu, tak jeho společnému působení s inhibitory tyrosinkinas došlo k nárůstu množství oxidovaného metabolitu MTS v ledvinách i jaterních mikrosomech. V ledvinách byl navíc oproti kontrolnímu vzorku pozorován nárůst množství methyl-p-tolyl sulfoxidu ve vzorku z potkanů vystavených působení samotného lenvatinibu, v játrech došlo naopak k většímu nárůstu po podání samotného vandetanibu.

6 DISKUZE

Inhibitory tyrosinkinas jsou v posledních letech hojně využívanou skupinou látek pro cílenou terapii mnoha typů rakoviny [1]. Značný počet studií se zabývá metabolismem inhibitorů tyrosinkinas a rolí enzymů v procesu biotransformace, na druhou stranu o vlivu inhibitorů tyrosinkinas na expresi a aktivitu těchto enzymů je známo jen velmi málo. Přitom právě změna exprese a aktivity enzymů může mít za následek nežádoucí interakce současně podávaných léčiv a jejich neblahé účinky na organismus [22]. Znalost faktorů a látek, které ovlivňují expresi a aktivitu odpovědných biotransformačních enzymů, je tedy jedním z hlavních předpokladů pro účinné působení léčiv [17]. Tato diplomová práce studuje působení inhibitorů tyrosinkinas vandetanibu a lenvatinibu a jejich současného podání s cytotoxickým alkaloidem ellipticinem na genovou expresi, proteinovou expresi a aktivitu vybraných potkaních biotransformačních enzymů.

V biotransformaci všech zkoumaných látek hrají velkou roli cytochromy P450. Hlavním enzymem podílejícím se na metabolismu vandetanibu je CYP3A4, pomocí kterého je vandetanib biotransformován na N-desmethylvandetanib. Druhým metabolitem vandetanibu je vandetanib-N-oxid, na který je léčivo oxidováno pomocí FMO1 v ledvinách a FMO3 v játrech [62]. Také lenvatinib poskytuje za katalýzy cytochromy P450 oxidované metabolity, lenvatinib N-oxid a N-desmethyllenvatinib. Ellipticin je primárně oxidován CYP1A1 a CYP1A2 na deriváty 9-hydroxy- a 7-hydroxyellipticin, což jsou detoxikační metabolity tohoto alkaloidu, nejaktivnější lidský cytochrom CYP3A4 ho s pomocí dalších izoform CYP, mimo jiné studovaných CYP1A1 a CYP1A2, přeměňuje na 12-hydroxy- a 13-hydroxyellipticin, které mohou tvořit kovalentní adukty DNA [79,82]. Posledním metabolitem ellipticinu je N²-oxid ellipticinu, který je tvořen především CYP2D6 [73,75].

Studium vlivu vandetanibu, lenvatinibu a ellipticinu na proteinovou expresi, genovou expresi a aktivitu CYP1A1/2 a CYP3A1/2 v jaterní tkáni bylo provedeno v loňském roce kolegyní Jelínkovou [84]. Předkládaná diplomová práce navazuje studiem vlivu těchto látek na proteinovou expresi, genovou expresi a aktivitu CYP1A1/2 v ledvinách a zároveň rozšiřuje studovanou problematiku o CYP1B1 a FMO1/3 jak v ledvinách, tak v jaterních tkáních pro získání komplexního pohledu na vliv zkoumaných látek na vybrané biotransformační enzymy v obou orgánech, které jsou u obratlovců nejbohatším zdrojem těchto biotransformačních enzymů. Lenvatinib je navíc používán k léčbě renálních karcinomů [67].

Po premedikaci potkanů samotnými inhibitory tyrosinkinas vandetanibem a lenvatinibem byla pozorována indukce exprese CYP1A1 v ledvinných vzorcích jak na genové, tak proteinové úrovni. Nárůstu exprese odpovídala v ledvinných mikrosomech z potkanů premedikovaných inhibitory tyrosinkinas také zvýšená enzymová aktivita podrodiny CYP1A, která byla stanovena metodou EROD. Tyto výsledky odpovídají výsledkům v jaterních tkáních [84] a nasvědčují tomu, že vandetanib a lenvatinib by mohly být induktory CYP1A1, což je jednou z klíčových informací této práce. Indukce CYP1A1, který se významně podílí na biotransformaci xenobiotik včetně léčiv, může vést k urychlení metabolismu a snížení účinnosti léčiva, které by bylo podáváno současně s inhibitory tyrosinkinas [22]. CYP1A1 navíc velmi významně participuje na přeměně různých prokarcinogenů na jejich aktivní formy (například benzo[*a*]pyren) [18]. Změna exprese CYP1A1 a biotransformačních enzymů obecně tedy může mít neblahé účinky na organismus.

Přítomnost CYP1A2 nebyla v ledvinných mikrosomech pomocí imunodetekce prokázána. Na úrovni genové exprese vedlo podání lenvatinibu k signifikantnímu dvojnásobnému nárůstu exprese *CYP1A2*. V diplomové práci Sandry Jelínkové byla v jaterních mikrosomech izoforma 1A2 detekována, samostatné podání inhibitorů tyrosinkinas však nevedlo k pozorovatelným změnám v proteinové expresi CYP1A2. Na genové úrovni také nebyl pozorován žádný vliv samostatně podaných inhibitorů tyrosinkinas [84]. Pro stanovení aktivity izoformy 1A2 byla využita *O*-demethylace 7-methoxyresorufinu, která se však ukázala jako nespecifická pro zkoumanou izoformu, neboť bylo na potkaních rekombinantních CYP1A1 a 1A2 v SupersomechTM prokázáno, že rozdíl mezi vlivem izoform na rychlost *O*-demethylace 7-methoxyresorufinu není příliš výrazný a není tedy možné tuto metodu považovat za specifickou pro izoformu 1A2. Samotné podání lenvatinibu vedlo k mírnému zvýšení rychlosti přeměny substrátu na produkt resorufin v obou studovaných orgánech [84], což však může souviset s indukcí izoformy 1A1. Na ledvinných mikrosomech byl také proveden pokus o stanovení aktivity CYP1A2 pomocí markerové reakce *O*-deethylace fenacetinu [109,110], která se však také ukázala jako nespecifická pro CYP1A2 v potkaních mikrosomech. Výsledky tudíž nejsou v této práci publikovány.

Podání vandetanibu i lenvatinibu vedlo u laboratorních potkanů k lehkému zvýšení hladiny izoformy 1B1 v ledvinách. Ačkoliv byly proužky odpovídající detekovanému proteinu velmi slabé, nárůst byl v porovnání s kontrolní skupinou, ve které se izoformu

detekovat nepodařilo, patrný. Tento výsledek naznačuje indukční potenciál inhibitorů tyrosinkinas také na proteinovou expresi CYP1B1. V jaterních mikrosomech však nebyla tato izoforma detekována ani ve tkáních z kontrolních potkanů, ani z potkanů premedikovaných vandetanibem či lenvatinibem. Podání lenvatinibu vedlo k mírnému nárůstu relativní genové exprese izoformy *1B1* v ledvinných frakcích, ve frakcích jaterních byla genová exprese srovnatelná se skupinou kontrolní po podání obou inhibitorů tyrosinkinas.

V případě FMO1 ani FMO3 nebyl pomocí imunodetekce prokázán pozorovatelný vliv inhibitorů tyrosinkinas na proteinové úrovni. Na úrovni genové exprese byly pozorovány pouze nevýznamné změny, mírné snížení relativní genové exprese *FMO1* bylo pozorováno v ledvinách po premedikaci samotným lenvatinibem. Pomocí markerové reakce oxidace methyl p-tolyl sulfidu bylo zjištěno, že podání vandetanibu v jaterních mikrosomech a lenvatinibu v ledvinných mikrosomech způsobilo nárůst aktivity FMO oproti kontrolním vzorkům. Není však možné s jistotou tvrdit, že reakce probíhá pouze za katalýzy FMO. Vzhledem k použití NADPH jako kofaktoru nelze vyloučit participaci CYP, které katalyzují podobné reakce jako FMO [34]. Ty by však měly svou katalytickou schopnost ztrácet v pufru o pH 9,5. Pro přesnější stanovení aktivity FMO by bylo nezbytné přidání inhibitorů specificky bránící katalýze dalšími enzymy.

Ellipticin je jakožto ligand jaderného Ah receptoru známým induktorem CYP1A [25]. V rámci této práce byl potvrzen indukční vliv ellipticinu na všechny zkoumané parametry pro izoformu 1A1 v ledvinách. V případě CYP1A2 nebyla indukce prokázána pouze na úrovni proteinové exprese, neboť nebyla tato izoforma v ledvinných mikrosomech vůbec detekována. V jaterních mikrosomech byl indukční vliv ellipticinu potvrzen pro obě izoformy jak na aktivitu, tak na proteinovou i genovou expresi.

Indukční vliv ellipticinu byl zaznamenán také na proteinové úrovni v případě izoformy 1B1 v ledvinných i jaterních mikrosomech. V ledvinách nedošlo po podání ellipticinu k ovlivnění genové exprese *CYP1B1*. Tento výsledek je vcelku překvapivý, neboť CYP1B1 je obdobně jako obě izoformy CYP1A inducibilní prostřednictvím Ah receptoru a bylo tedy očekáváno, že podání ellipticinu bude mít na relativní genovou expresi *CYP1B1* podobný vliv jako na relativní genovou expresi CYP podrodiny 1A, neboť se jedná o ligand Ah receptoru s velmi silným indukčním vlivem na CYP1A. V jaterních vzorcích

premedikace ellipticinem způsobila výrazný nárůst relativní genové exprese *CYP1B1*, jak bylo předpokládáno.

Proteinová exprese flavinových monooxygenas byla v obou studovaných orgánech po podání samotného ellipticinu srovnatelná s kontrolní skupinou. Také relativní genová exprese *FMO1* a *FMO3* v ledvinných vzorcích nebyla aplikací ellipticinu ovlivněna, v jaterních vzorcích došlo k velmi mírné supresi genové exprese FMO. Ačkoliv je v literatuře uváděno, že se jedná o enzymy inducibilní prostřednictvím Ah receptoru [40,41], tedy stejným mechanismem jako v případě CYP1A a CYP1B1, v této práci se indukční vliv ellipticinu, jakožto ligandu Ah receptoru a účinného induktoru zkoumaných CYP, na FMO prokázat nepodařilo. V obou studovaných orgánech došlo však ke zvýšení aktivity FMO ve vzorcích premedikovaných ellipticinem.

Kromě tří zkoumaných látek byly také studovány kombinace ellipticinu s jednotlivými inhibitory tyrosinkinas. Cílem bylo zjistit, zda bude při kombinovaném podání zaznamenána změna vlivu oproti samostatně podanému ellipticinu. V případě *CYP1A1* byl pozorován ještě větší nárůst genové exprese této izoformy v ledvinných vzorcích než po premedikaci samotným ellipticinem. V játrech byla sice genová exprese *CYP1A1* také indukována po premedikaci kombinací ellipticinu s inhibitory tyrosinkinas, indukční vliv se však nejevil vyšší než po podání samotného ellipticinu [84].

V ledvinných vzorcích došlo k velkému nárůstu genové exprese *CYP1A2* po premedikaci ellipticinem v kombinaci s lenvatinibem. Jelikož však nebyla tato izoforma v ledvinných mikrosomech detekována, znamená to, že indukce genové exprese této izoformy nebyla zvýšena natolik, aby se projevila také indukce proteinové exprese. V jaterních vzorcích byla indukce genové exprese *CYP1A2* nejvyšší ve vzorku premedikovaném kombinací ellipticinu s vandetanibem [84]. V obou orgánech došlo ke zvýšení enzymové aktivity CYP1A, stanovené markerovými reakcemi EROD a MROD, po premedikaci kombinacemi ellipticinu s inhibitory tyrosinkinas. Získané výsledky naznačují, že inhibitory tyrosinkinas zvyšují indukční potenciál ellipticinu na CYP podrodiny 1A.

K signifikantnímu nárůstu genové exprese *CYP1B1* v ledvinách došlo po premedikaci ellipticinem v kombinaci s lenvatinibem. V případě jaterních vzorků byla pozorována indukce genové exprese *CYP1B1* po podání kombinací ellipticinu s oběma inhibitory tyrosinkinas.

V případě flavinových monooxygenas nebyl ani v jednom studovaném orgánu prokázán indukční vliv ellipticinu na proteinovou expresi ani v kombinaci s inhibitory tyrosinkinas. Naopak byl v ledvinných mikrosomech pozorován náznak snížení proteinové exprese izoformy FMO3. Relativní genová exprese nebyla výrazně ovlivněna ellipticinem v kombinaci s inhibitory tyrosinkinas. Podání ellipticinu v kombinaci s vandetanibem vedlo v ledvinách pouze k mírnému zvýšení a v játrech k velmi malému snížení genové exprese *FMO3*. Obě tyto změny jsou však nepatrné. Výraznější změny byly zaznamenány při sledování vlivu ellipticinu v kombinaci s inhibitory tyrosinkinas na enzymovou aktivitu oxidace methyl-p-tolyl sulfidu, přisuzovanou FMO. V obou studovaných orgánech došlo k výraznému nárůstu aktivity FMO po podání ellipticinu v kombinaci s inhibitory tyrosinkinas.

7 ZÁVĚR

V této diplomové práci byl zkoumán vliv inhibitorů tyrosinkinas vandetanibu a lenvatinibu a cytotoxického alkaloidu ellipticinu na vybrané biotransformační enzymy v modelovém organismu laboratorního potkana *in vivo*. Cílem bylo charakterizovat vliv zkoumaných látek na genovou expresi, proteinovou expresi a aktivitu cytochromů P450 1A1, 1A2 a 1B1 a flavinových monooxygenas FMO1 a FMO3 v ledvinných a jaterních mikrosomech.

Hlavní závěry předkládané diplomové práce:

- Vandetanib a lenvatinib jsou potenciálními induktory CYP1A1 na úrovni genové exprese, proteinové exprese i enzymové aktivity
- Ellipticin je prokazatelně induktorem CYP1A1, CYP1A2 a CYP1B1
- Inhibitory tyrosinkinas zvyšují indukční potenciál ellipticinu na CYP1A1/1A2
- Flavinové monooxygenasy nebyly významně ovlivněny zkoumanými látkami na úrovni proteinové či genové exprese

8 SEZNAM LITERATURY

1. Hojjat-Farsangi, M. (2014) Small-molecule inhibitors of the receptor tyrosine kinases: promising tools for targeted cancer therapies. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 13768–801.
2. “FDA-approved protein kinase inhibitors” [online]. Dostupné z: <http://www.brimr.org/PKI/PKIs.htm>. [zobrazeno 26-02-2019].
3. Stiborová M., Hudeček J., Hodek P., Frei E. (1999) Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chem. Listy* **93**, 229–37.
4. Parkinson A., Ogilvie B.W., Buckley D.B., Kazmi F., Czerwinski M., Parkinson O. (2007) Biotransformation of xenobiotics in *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons* (McGraw-Hill, New York), 133–224.
5. Timbrell, J.A., Marrs, T.C. (2009) Biotransformation of Xenobiotics in *General and Applied Toxicology* (John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK).
6. Hanninen, O.O.P., Atalay, M. (2009) Biotransformation of xenobiotics and hormones in *Physiology and maintenance* (Eolss Publishers Co Ltd, Oxford).
7. Krishna, D.R., Klotz, U. (1994) Extrahepatic metabolism of drugs in humans. *Clin. Pharmacokinet.* **26**, 144–60.
8. Bernhardt, R. (2006) Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *Journal of Biotechnology* **124**, 128–45.
9. Omura Tsuneo, Sato Ryo (1964) The Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes. *Journal of Biological Chemistry* **239**, 2370–78.
10. Hannemann, F., Bichet, A., Ewen, K.M., Bernhardt, R. (2007) Cytochrome P450 systems—biological variations of electron transport chains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1770**, 330–44.
11. Mansuy, D. (1998) The great diversity of reactions catalyzed by cytochromes P450. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* **121**, 5–14.
12. Guengerich, F.P. (2001) Common and Uncommon Cytochrome P450 Reactions Related to Metabolism and Chemical Toxicity. *Chemical Research in Toxicology* **14**, 611–50.
13. Werck-Reichhart, D., Feyereisen, R. (2000) Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol.* **1**.
14. Stiborová M., Hudeček J., Páca J., Páca J. Jr., Martínek V. (2004) Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí. *Chem. Listy* **98**, 876–90.
15. Ener, M.E., Lee, Y.-T., Winkler, J.R., Gray, H.B., Cheruzel, L. (2010) Photooxidation of cytochrome P450-BM3. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 18783–86.
16. “Cytochrome P450 Homepage” [online]. Dostupné z: <https://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html>. [zobrazeno 28-04-2019].
17. Zanger, U.M., Schwab, M. (2013) Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & Therapeutics* **138**, 103–41.
18. Martignoni, M., Groothuis, G.M.M., de Kanter, R. (2006) Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism,

- inhibition and induction. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* **2**, 875–94.
19. Novak, R.F., Woodcroft, K.J. (2000) The alcohol-inducible form of cytochrome P450 (CYP 2E1): role in toxicology and regulation of expression. *Arch. Pharm. Res.* **23**, 267–82.
 20. Guengerich, F.P. (2008) Cytochrome P450 and Chemical Toxicology. *Chemical Research in Toxicology* **21**, 70–83.
 21. Williams, J.A. (2004) Drug-drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates: A pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure AUCi/AUC ratios. *Drug Metabolism and Disposition* **32**, 1201–8.
 22. Wienkers, L.C., Heath, T.G. (2005) Predicting in vivo drug interactions from in vitro drug discovery data. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**, 825–33.
 23. Nebert, D.W., Dalton, T.P., Okey, A.B., Gonzalez, F.J. (2004) Role of Aryl Hydrocarbon Receptor-mediated Induction of the CYP1 Enzymes in Environmental Toxicity and Cancer. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 23847–50.
 24. Ding, X., Kaminsky, L.S. (2003) Human Extrahepatic Cytochromes P450: Function in Xenobiotic Metabolism and Tissue-Selective Chemical Toxicity in the Respiratory and Gastrointestinal Tracts. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **43**, 149–73.
 25. Aimová, D., Svobodová, L., Kotrbová, V., Mrázová, B., Hodek, P., Hudecek, J., Václavíková, R., Frei, E., Stiborová, M. (2007) The anticancer drug ellipticine is a potent inducer of rat cytochromes P450 1A1 and 1A2, thereby modulating its own metabolism. *Drug Metab. Dispos.* **35**, 1926–34.
 26. Denison, M.S., Whitlock, J.P. (1995) Xenobiotic-inducible Transcription of Cytochrome P450 Genes. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 18175–78.
 27. Murray, G.I., Taylor, M.C., McFadyen, M.C., McKay, J.A., Greenlee, W.F., Burke, M.D., Melvin, W.T. (1997) Tumor-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Cancer Res.* **57**, 3026–31.
 28. Sutter, T.R., Tang, Y.M., Hayes, C.L., Wo, Y.Y., Jabs, E.W., Li, X., Yin, H., Cody, C.W., Greenlee, W.F. (1994) Complete cDNA sequence of a human dioxin-inducible mRNA identifies a new gene subfamily of cytochrome P450 that maps to chromosome 2. *J. Biol. Chem.* **269**, 13092–99.
 29. Dutour, R., Poirier, D. (2017) Inhibitors of cytochrome P450 (CYP) 1B1. *Eur. J. Med. Chem.* **135**, 296–306.
 30. Phillips, I.R., Shephard, E.A. (2017) Drug metabolism by flavin-containing monooxygenases of human and mouse. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* **13**, 167–81.
 31. Phillips, I.R., Dolphin, C.T., Clair, P., Hadley, M.R., Hutt, A.J., McCombie, R.R., Smith, R.L., Shephard, E.A. (1995) The molecular biology of the flavin-containing monooxygenases of man. *Chemico-Biological Interactions* **96**, 17–32.
 32. Hines, R.N. (2002) Alternative Processing of the Human FMO6 Gene Renders Transcripts Incapable of Encoding a Functional Flavin-Containing Monooxygenase. *Molecular Pharmacology* **62**, 320–25.

33. Siddens, L.K., Krueger, S.K., Henderson, M.C., Williams, D.E. (2014) Mammalian flavin-containing monooxygenase (FMO) as a source of hydrogen peroxide. *Biochemical Pharmacology* **89**, 141–47.
34. Krueger, S.K., Williams, D.E. (2005) Mammalian flavin-containing monooxygenases: structure/function, genetic polymorphisms and role in drug metabolism. *Pharmacology & Therapeutics* **106**, 357–87.
35. Alfieri, A., Malito, E., Orru, R., Fraaije, M.W., Mattevi, A. (2008) Revealing the moonlighting role of NADP in the structure of a flavin-containing monooxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 6572–77.
36. Rossner, R., Kaeberlein, M., Leiser, S.F. (2017) Flavin-containing monooxygenases in aging and disease: Emerging roles for ancient enzymes. *J. Biol. Chem.* **292**, 11138–46.
37. Lee, M.-Y., Smiley, S., Kadkhodayan, S., Hines, R.N., Williams, D.E. (1995) Developmental regulation of flavin-containing monooxygenase (FMO) isoforms 1 and 2 in pregnant rabbit. *Chemico-Biological Interactions* **96**, 75–85.
38. Cashman, J.R. (2005) Some distinctions between flavin-containing and cytochrome P450 monooxygenases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **338**, 599–604.
39. Maté, L., Giantin, M., Viviani, P., Ballent, M., Tolosi, R., Lifschitz, A., Lanusse, C., Dacasto, M., Virkel, G. (2019) Effects of fenbendazole and triclabendazole on the expression of cytochrome P450 1A and flavin-monooxygenase isozymes in bovine precision-cut liver slices. *The Veterinary Journal* **245**, 61–69.
40. Celius, T., Roblin, S., Harper, P.A., Matthews, J., Boutros, P.C., Pohjanvirta, R., Okey, A.B. (2008) Aryl Hydrocarbon Receptor-Dependent Induction of Flavin-Containing Monooxygenase mRNAs in Mouse Liver. *Drug Metabolism and Disposition* **36**, 2499–2505.
41. Celius, T., Pansoy, A., Matthews, J., Okey, A.B., Henderson, M.C., Krueger, S.K., Williams, D.E. (2010) Flavin-containing monooxygenase-3: Induction by 3-methylcholanthrene and complex regulation by xenobiotic chemicals in hepatoma cells and mouse liver. *Toxicology and Applied Pharmacology* **247**, 60–69.
42. Lattard, V., Lachuer, J., Buronfosse, T., Garnier, F., Benoit, E. (2002) Physiological factors affecting the expression of FMO1 and FMO3 in the rat liver and kidney. *Biochemical Pharmacology* **63**, 1453–64.
43. Sacha, T. (2013) Imatinib in Chronic Myeloid Leukemia: an Overview. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases* **6**, 2014007.
44. Zhang, N., Liu, Y., Jeong, H. (2015) Drug-Drug Interaction Potentials of Tyrosine Kinase Inhibitors via Inhibition of UDP-Glucuronosyltransferases. *Sci. Rep.* **5**, 17778.
45. Hubbard, S.R., Till, J.H. (2000) Protein Tyrosine Kinase Structure and Function. *Annual Review of Biochemistry* **69**, 373–98.
46. Drake, J.M., Lee, J.K., Witte, O.N. (2014) Clinical Targeting of Mutated and Wild-Type Protein Tyrosine Kinases in Cancer. *Molecular and Cellular Biology* **34**, 1722–32.
47. Yim, E.-K., Siwko, S., Lin, S.-Y. (2009) Exploring Rak tyrosine kinase function in breast cancer. *Cell Cycle* **8**, 2360–64.

48. Schlessinger, J., Lemmon, M.A. (2003) SH2 and PTB domains in tyrosine kinase signaling. *Sci. STKE* **2003**, RE12.
49. Del Rosario, A.M., White, F.M. (2010) Quantifying oncogenic phosphotyrosine signaling networks through systems biology. *Current Opinion in Genetics & Development* **20**, 23–30.
50. Wiesmann, C., Muller, Y.A., de Vos, A.M. (2000) Ligand-binding sites in Ig-like domains of receptor tyrosine kinases. *J. Mol. Med.* **78**, 247–60.
51. Chandrasekharan, S., Qiu, T.H., Alkharouf, N., Brantley, K., Mitchell, J.B., Liu, E.T. (2002) Characterization of Mice Deficient in the Src Family Nonreceptor Tyrosine Kinase Frk/rak. *Molecular and Cellular Biology* **22**, 5235–47.
52. Biscardi, J.S., Tice, D.A., Parsons, S.J. (1999) c-Src, Receptor Tyrosine Kinases, and Human Cancer in *Advances in Cancer Research* (Elsevier), 61–119.
53. Krause, D.S., Van Etten, R.A. (2005) Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *N. Engl. J. Med.* **353**, 172–87.
54. Smith, K.M., Yacobi, R., Van Etten, R.A. (2003) Autoinhibition of Bcr-Abl through its SH3 domain. *Mol. Cell* **12**, 27–37.
55. Gustafson, D.L. (2006) Tissue Distribution and Metabolism of the Tyrosine Kinase Inhibitor ZD6474 (Zactima) in Tumor-Bearing Nude Mice following Oral Dosing. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **318**, 872–80.
56. Ciardiello, F., Caputo, R., Damiano, V., Caputo, R., Troiani, T., Vitagliano, D., Carlomagno, F., Veneziani, B.M., Fontanini, G., Bianco, A.R., Tortora, G. (2003) Antitumor effects of ZD6474, a small molecule vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, with additional activity against epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Clin. Cancer Res.* **9**, 1546–56.
57. Hennequin, L.F., Stokes, E.S.E., Thomas, A.P., Johnstone, C., Plé, P.A., Ogilvie, D.J., Dukes, M., Wedge, S.R., Kendrew, J., Curwen, J.O. (2002) Novel 4-anilinoquinazolines with C-7 basic side chains: design and structure activity relationship of a series of potent, orally active, VEGF receptor tyrosine kinase inhibitors. *J. Med. Chem.* **45**, 1300–1312.
58. Wedge, S.R., Ogilvie, D.J., Dukes, M., Kendrew, J., Chester, R., Jackson, J.A., Boffey, S.J., Valentine, P.J., Curwen, J.O., Musgrove, H.L., Graham, G.A., Hughes, G.D., Thomas, A.P., Stokes, E.S.E., Curry, B., Richmond, G.H.P., Wadsworth, P.F., Bigley, A.L., Hennequin, L.F. (2002) ZD6474 inhibits vascular endothelial growth factor signaling, angiogenesis, and tumor growth following oral administration. *Cancer Res.* **62**, 4645–55.
59. Brančíková D., Adámková Krákorová D. (2008) Sunitinib. *Remedia* **18**, 187–93.
60. Thornton, K., Kim, G., Maher, V.E., Chattopadhyay, S., Tang, S., Moon, Y.J., Song, P., Marathe, A., Balakrishnan, S., Zhu, H., Garnett, C., Liu, Q., Booth, B., Gehrke, B., Dorsam, R., Verbois, L., Ghosh, D., Wilson, W., Duan, J., Sarker, H., Miksinski, S.P., Skarupa, L., Ibrahim, A., Justice, R., Murgo, A., Pazdur, R. (2012) Vandetanib for the Treatment of Symptomatic or Progressive Medullary Thyroid Cancer in Patients with Unresectable Locally Advanced or Metastatic Disease: U.S. Food and Drug Administration Drug Approval Summary. *Clinical Cancer Research* **18**, 3722–30.

61. Antonelli, A., Fallahi, P., Di Bari, F., Ferrari, S.M., Spisni, R., Materazzi, G., Miccoli, P., Benvenga, S. (2015) Selective use of vandetanib in the treatment of thyroid cancer. *Drug Design, Development and Therapy*, 3459.
62. Martin, P., Oliver, S., Robertson, J., Kennedy, S.-J., Read, J., Duvauchelle, T. (2011) Pharmacokinetic Drug Interactions with Vandetanib during Coadministration with Rifampicin or Itraconazole. *Drugs in R&D* **11**, 37–51.
63. Martin, P., Oliver, S., Kennedy, S.-J., Partridge, E., Hutchison, M., Clarke, D., Giles, P. (2012) Pharmacokinetics of vandetanib: three phase I studies in healthy subjects. *Clin Ther* **34**, 221–37.
64. Clinical Pharmacology Review: Vandetanib (2010).
65. Tohyama, O., Matsui, J., Kodama, K., Hata-Sugi, N., Kimura, T., Okamoto, K., Minoshima, Y., Iwata, M., Funahashi, Y. (2014) Antitumor Activity of Lenvatinib (E7080): An Angiogenesis Inhibitor That Targets Multiple Receptor Tyrosine Kinases in Preclinical Human Thyroid Cancer Models. *Journal of Thyroid Research* **2014**, 1–13.
66. Dubbelman, A.-C., Rosing, H., Nijenhuis, C., Huitema, A.D.R., Mergui-Roelvink, M., Gupta, A., Verbel, D., Thompson, G., Shumaker, R., Schellens, J.H.M., Beijnen, J.H. (2015) Pharmacokinetics and excretion of ¹⁴C-lenvatinib in patients with advanced solid tumors or lymphomas. *Investigational New Drugs* **33**, 233–40.
67. Dubbelman, A.-C., Nijenhuis, C.M., Jansen, R.S., Rosing, H., Mizuo, H., Kawaguchi, S., Critchley, D., Shumaker, R., Schellens, J.H.M., Beijnen, J.H. (2016) Metabolite profiling of the multiple tyrosine kinase inhibitor lenvatinib: a cross-species comparison. *Investigational New Drugs* **34**, 300–318.
68. Inoue, K., Asai, N., Mizuo, H., Fukuda, K., Kusano, K., Yoshimura, T. (2012) Unique Metabolic Pathway of [¹⁴C]Lenvatinib after Oral Administration to Male Cynomolgus Monkey. *Drug Metabolism and Disposition* **40**, 662–70.
69. Vavrová K. (2018) Metabolismus inhibitoru tyrosinkinas lenvatinibu jako protinádorového léčiva s cílenými účinky. Diplomová práce PŘF UK Praha, katedra biochemie.
70. Inoue, K., Mizuo, H., Kawaguchi, S., Fukuda, K., Kusano, K., Yoshimura, T. (2014) Oxidative Metabolic Pathway of Lenvatinib Mediated by Aldehyde Oxidase. *Drug Metabolism and Disposition* **42**, 1326–33.
71. Goodwin, S., Smith, A.F., Horning, E.C. (1959) Alkaloids of Ochrosia elliptica Labill.¹. *Journal of the American Chemical Society* **81**, 1903–8.
72. Stiborová, M., Rupertová, M., Frei, E. (2011) Cytochrome P450- and peroxidase-mediated oxidation of anticancer alkaloid ellipticine dictates its anti-tumor efficiency. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **1814**, 175–85.
73. Indra, R., Černá, T., Heger, Z., Hraběta, J., Wilhelm, M., Dostálová, S., Lengálová, A., Martínková, M., Adam, V., Eckschlager, T., Schmeiser, H.H., Arlt, V.M., Stiborová, M. (2019) Ellipticine-loaded apoferritin nanocarrier retains DNA adduct-based cytochrome P450-facilitated toxicity in neuroblastoma cells. *Toxicology* **419**, 40–54.
74. Kuo, P.-L., Hsu, Y.-L., Kuo, Y.-C., Chang, C.-H., Lin, C.-C. (2005) The anti-proliferative inhibition of ellipticine in human breast mda-mb-231 cancer cells is through cell cycle arrest and apoptosis induction: *Anti-Cancer Drugs* **16**, 789–95.

75. Stiborová, M., Černá, V., Moserová, M., Mrázová, I., Arlt, V., Frei, E. (2014) The Anticancer Drug Ellipticine Activated with Cytochrome P450 Mediates DNA Damage Determining Its Pharmacological Efficiencies: Studies with Rats, Hepatic Cytochrome P450 Reductase Null (HRNTM) Mice and Pure Enzymes. *International Journal of Molecular Sciences* **16**, 284–306.
76. Fleury, C., Mignotte, B., Vayssière, J.-L. (2002) Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie* **84**, 131–41.
77. Kang, Y.-H., Lee, S.-J. (2008) The role of p38 MAPK and JNK in Arsenic trioxide-induced mitochondrial cell death in human cervical cancer cells. *Journal of Cellular Physiology* **217**, 23–33.
78. Cande, C. (2002) Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? *Journal of Cell Science* **115**, 4727–34.
79. Kim, J.Y., Lee, S.G., Chung, J.-Y., Kim, Y.-J., Park, J.-E., Koh, H., Han, M.S., Park, Y.C., Yoo, Y.H., Kim, J.-M. (2011) Ellipticine induces apoptosis in human endometrial cancer cells: The potential involvement of reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinases. *Toxicology* **289**, 91–102.
80. Ohashi, M., Sugikawa, E., Nakanishi, N. (1995) Inhibition of p53 protein phosphorylation by 9-hydroxyellipticine: a possible anticancer mechanism. *Jpn. J. Cancer Res.* **86**, 819–27.
81. Xu, G.W., Mawji, I.A., Macrae, C.J., Koch, C.A., Datti, A., Wrana, J.L., Dennis, J.W., Schimmer, A.D. (2008) A high-content chemical screen identifies ellipticine as a modulator of p53 nuclear localization. *Apoptosis* **13**, 413–22.
82. Stiborová, M., Sejbál, J., Bořek-Dohalská, L., Aimová, D., Poljaková, J., Forsterová, K., Rupertová, M., Wiesner, J., Hudeček, J., Wiessler, M., Frei, E. (2004) The Anticancer Drug Ellipticine Forms Covalent DNA Adducts, Mediated by Human Cytochromes P450, through Metabolism to 13-Hydroxyellipticine and Ellipticine N²-Oxide. *Cancer Research* **64**, 8374–80.
83. Stiborová, M., Breuer, A., Aimová, D., Stiborová-Rupertová, M., Wiessler, M., Frei, E. (2003) DNA adduct formation by the anticancer drug ellipticine in rats determined by ³²P postlabeling: DNA Adducts of Ellipticine in Rats. *International Journal of Cancer* **107**, 885–90.
84. Jelínková S. (2018) Vliv vandetanibu, lenvatinibu a ellipticinu na expresi potkaních cytochromů P450 1A a 3A. Diplomová práce PřF UK Praha, katedra biochemie.
85. Lindström-Seppä, P., Koivusaari, U., Hänninen, O. (1983) Metabolism of foreign compounds in freshwater crayfish (*Astacus astacus* L.) tissues. *Aquatic Toxicology* **3**, 35–46.
86. “Pierce Microplate BCA Protein Assay Kit” [online]. Dostupné z: https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FSLSG%2Fmanuals%2FMAN0011614_Pierce_MicroplateBCAProteinAssay_ReducAgntComp_UG.pdf [zobrazeno 26-02-2019].
87. Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76–85.

88. Wiechelman, K.J., Braun, R.D., Fitzpatrick, J.D. (1988) Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal. Biochem.* **175**, 231–37.
89. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–85.
90. Mahmood, T., Yang, P.-C. (2012) Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N. Am. J. Med. Sci.* **4**, 429–34.
91. “Fastblot Semi-Dry Electrophoretic Transfer Apparatus - Instruction Manual” [online]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/profile/Houda_Kawas/post/what_is_the_best_voltage_and_time_for_transferring_the_protein_with_14_6_kDa_from_gel_to_nitrocellulose_membrane_by_semi-dry_transfer_systems/attachment/59d63ad679197b8077997e80/AS%3A407631685537793%401474198375672/download/Manual_Fastblot_2009-07.pdf [zobrazeno 26-02-2019].
92. “Trans-Blot® Turbo™ Blotting System - Instruction Manual” [online]. Dostupné z: <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10020688.pdf> [zobrazeno 26-02-2019].
93. Schiwy, A., Brinkmann, M., Thiem, I., Guder, G., Winkens, K., Eichbaum, K., Nüßer, L., Thalmann, B., Buchinger, S., Reifferscheid, G., Seiler, T.-B., Thoms, B., Hollert, H. (2015) Determination of the CYP1A-inducing potential of single substances, mixtures and extracts of samples in the micro-EROD assay with H4IIE cells. *Nat Protoc* **10**, 1728–41.
94. Chen, J.J., Chen, G.S., Bunce, N.J. (2003) Inhibition of CYP 1A2-dependent MROD activity in rat liver microsomes: an explanation of the hepatic sequestration of a limited subset of halogenated aromatic hydrocarbons. *Environ. Toxicol.* **18**, 115–19.
95. “Human FMO1 SUPERSOMES” [online]. Dostupné z: https://certs-ecatalog.corning.com/life-sciences/certs/456241_8059001.pdf. [zobrazeno 28-04-2019].
96. “Human FMO3 SUPERSOMES” [online]. Dostupné z: https://certs-ecatalog.corning.com/life-sciences/certs/456233_8115002.pdf. [zobrazeno 28-04-2019].
97. Furnes, B. (2004) Evaluation of Xenobiotic N- and S-Oxidation by Variant Flavin-Containing Monooxygenase 1 (FMO1) Enzymes. *Toxicological Sciences* **78**, 196–203.
98. Rodríguez-Fuentes, G., Coburn, C., Currás-Collazo, M., Guillén, G., Schlenk, D. (2009) Effect of hyperosmotic conditions on flavin-containing monooxygenase activity, protein and mRNA expression in rat kidney. *Toxicology Letters* **187**, 115–18.
99. Siddens, L.K., Henderson, M.C., VanDyke, J.E., Williams, D.E., Krueger, S.K. (2008) Characterization of mouse flavin-containing monooxygenase transcript levels in lung and liver, and activity of expressed isoforms. *Biochemical Pharmacology* **75**, 570–79.
100. Schlenk, D., Yeung, C., Rettie, A. (2004) Unique monooxygenation pattern indicates novel flavin-containing monooxygenase in liver of rainbow trout. *Marine Environmental Research* **58**, 499–503.

101. “Direct-zol RNA Miniprep Plus Kits” [online]. Dostupné z: <https://www.zymoresearch.com/collections/direct-zol-rna-kits/products/direct-zol-rna-miniprep-plus-kits> [zobrazeno 28-04-2019].
102. Okamoto, T., Okabe, S. (2000) Ultraviolet absorbance at 260 and 280 nm in RNA measurement is dependent on measurement solution. *Int. J. Mol. Med.* **5**, 657–59.
103. Barbas, C.F., Burton, D.R., Scott, J.K., Silverman, G.J. (2007) Quantitation of DNA and RNA. *Cold Spring Harbor Protocols* **2007**.
104. “NanoDrop Spectrophotometers - 260/280 and 260/230 Ratios” [online]. Dostupné z: <http://www.nhm.ac.uk/content/dam/nhmwww/our-science/dpts-facilities-staff/Coreresearchlabs/nanodrop.pdf>. [zobrazeno 28-04-2019].
105. Santos, C.F. dos, Sakai, V.T., Machado, M.A. de A.M., Schippers, D.N., Greene, A.S. (2004) Reverse transcription and polymerase chain reaction: principles and applications in dentistry. *Journal of Applied Oral Science* **12**, 1–11.
106. “High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit” [online]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4368814> [zobrazeno 28-04-2019].
107. “FastStart Essential DNA Probes Master” [online]. Dostupné z: https://lifescience.roche.com/en_cz/products/faststart-essential-dna-probes-master.html. [zobrazeno 28-04-2019].
108. Steinbacher, A., Buback, J., Nuernberger, P., Brixner, T. (2012) Precise and rapid detection of optical activity for accumulative femtosecond spectroscopy. *Optics Express* **20**, 11838.
109. Venkatakrishnan, K., von Moltke, L.L., Greenblatt, D.J. (1998) Human cytochromes P450 mediating phenacetin O-deethylation in vitro: validation of the high affinity component as an index of CYP1A2 activity. *J Pharm Sci* **87**, 1502–7.
110. von Moltke, L.L., Greenblatt, D.J., Duan, S.X., Schmider, J., Kudchadker, L., Fogelman, S.M., Harmatz, J.S., Shader, R.I. (1996) Phenacetin O-deethylation by human liver microsomes in vitro: inhibition by chemical probes, SSRI antidepressants, nefazodone and venlafaxine. *Psychopharmacology (Berl.)* **128**, 398–407.

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádné vedena evidence vypůjčovateli.

| Jméno a příjmení Adresa | Číslo OP | Datum vypůjčení | Poznámka |
|------------------------------------|-----------------|----------------------------|-----------------|
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |